UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Flaco OK
10/05/02

INSTITUTO DE QUÍMICA

1241359

25318

TELMA TIEMI SCHWINDT

**PAPEL DE CICLINA D1 NA INTERAÇÃO ENTRE FGF-2,
ACTH E OUTROS PEPTÍDEOS NA SINALIZAÇÃO EM
CÉLULAS ADRENOCORTICAIS Y-1**

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

SÃO PAULO

20/11/2001

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004477

Ficha Catalográfica

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

Schwindt, Telma Tiemi
S415p Papel de ciclina D1 na interação entre FGF-2, Acth e
outros peptídeos na sinalização em células adrenocorticais
Y-1 / Telma Tiemi Schwindt. -- São Paulo, 2001.
118p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Armelin, Hugo Aguirre

1. Biologia molecular 2. Biologia celular I. T. II.
Armelin, Hugo Aguirre, orientador.

574.88 CDD

**“Papel de Ciclina D1 na Interação Entre FGF-2,
ACTH e Outros Peptídeos na Sinalização em
Células Andrenocorticais Y-1”**

TELMA TIEMI SCHWINDT

*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. PAULO LEE HO
IB

Prof. Dr. ANTONIO ROBERTO MARTINS
FMRP - USP

Prof. Dr. JOÃO BOSCO PESQUERO
UNIFESP

Prof. Dr. BRYAN ERIC STRAUSS
ICB - USP

SÃO PAULO
20 DE NOVEMBRO 2001.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todos que participaram ativamente e acompanharam este trabalho e que muito me ajudaram para tornar esta tese "real".

Aos meus pais, pelo apoio, incentivo e paciência nos momentos difíceis em que tudo parecia dar errado e por acreditarem sempre em mim.

Ao meu irmão Newton e minha cunhada Virgínia, e aos queridos Giselle e George, que sempre acompanharam minha vida.

Ao Prof. Hugo Aguirre Armelin, pela oportunidade que me ofereceu de trabalhar em seu laboratório, onde pude aprender muito e crescer profissionalmente.

Aos amigos do laboratório, que são:

Miriam Santos de Moraes, que além de colega no trabalho tornou-se uma grande amiga, me ensinou muitas coisas e sempre teve paciência comigo quando o desânimo surgia, e pelas risadas no laboratório, até mesmo quando as coisas não davam certo.

Ivan Tadeu Rebustini, meu grande amigo, pela cooperação no trabalho e por estar sempre pronto para me ajudar quando precisei.

Kátia Maria da Rocha, que se tornou tão especial, pelas sugestões e conselhos no trabalho e por ser essa pessoa que admiro pessoal e profissionalmente.

Maria do Céu, sem a qual a pesquisa não seria possível, é igualmente especial, soube conquistar a todos e tornou o ambiente de trabalho mais alegre e agradável. É uma pessoa única.

Paulinha e "Ericão", não poderia deixá-los separados nem nos agradecimentos! Obrigada pela convivência harmoniosa e pela cooperação, que tornaram o dia a dia muito mais agradável.

Alexandre Dermagos, pela convivência amigável e pela ajuda na parte de informática.

Fábio L. Forti, pelas discussões produtivas do trabalho, que muito me ajudaram.

Aos novos amigos Gilson e Carol, que se juntaram a nós, pela amizade e cooperação que têm se desenvolvido.

A Claudimara F.P. Lotfi, pelas sugestões e conselhos e também pelo estímulo nos momentos de ansiedade.

A todo o pessoal dos laboratórios das Profs. Mari Sogayar, Bianca Zingales e Ohara Augusto, pela ajuda técnica, pelos reagentes e equipamentos emprestados, pelas sugestões e principalmente pelo convívio.

Aos Profs. Ângelo Gambarini, Luiz Juliano e Maria Juliano pelos peptídeos cedidos e utilização de equipamentos.

Aos amigos Fábio Bei, Marco Antônio, Humberto, Margô, Valdemir, Gláucia Hajj, Carlos Nalvo, Eduardo Purgatto, Wilson Toselli, Wagner Quintílio, Helotônio Carvalho, Ivan Nascimento, Léo Iwai, Flávio Koti e Emerson Wan, que apesar de não vê-los todos os dias, acompanharam meu trabalho.

Aos amigos Cláudia Eichler, Ana Paula Lepique, Patrícia Matheus de Medeiros, Maurício Moraes e Priscilla, que estão fora do país mas continuam sendo muito importantes para mim, estando sempre tão perto, apesar de tão longe.

A Lia Nakao e Sílvia Zanata, que acima de tudo são meus amigos pessoais de muito tempo, sempre me ajudaram e incentivaram muito, e que sabem o quanto são importantes e queridos para mim.

A Edlaine Linares, por ter uma infinita paciência para ouvir minhas reclamações, pela força, ajuda e grande incentivo nos momentos complicados e também pelas "broncas" quando eu merecia, enfim pela amizade leal e verdadeira.

Ao Chiquinho e Jaílton do xerox e ao pessoal do protocolo e da secretaria de pós-graduação, pela ajuda e paciência.

A Deus, que colocou estas e outras pessoas em meu caminho nos lugares e momentos certos, e que sempre me deu força para continuar, ainda que eu quisesse desistir.

SUMMARY	1
RESUMO	2
ABREVIATURAS	3
I - INTRODUÇÃO	5
I.1 - Ciclo Celular	6
I.2 - Vias de Transdução de Sinal	9
Receptores de Tirosina Quinase (RTKs)	10
Via de receptores acoplados a proteína G	11
Via de PKA	13
Via de PI3K	14
Ciclins e CDKs	15
Regulação do ciclo celular por E2Fs	17
I.3 - Fatores de Crescimento e Hormônios	18
Peptídeos derivados de POMC	18
Angiotensina I e II	21
Oxitocina e Vasopressina	21
FGFs (Fibroblast Growth Factors)	22
I.4 - A linhagem Y-1	23
II - RELEVÂNCIA E OBJETIVOS	25
III - MATERIAIS	28
III.1 - Linhagem Celular Y-1:	29
III.2 - Plasmídeos:	29
III.3 - Anticorpos:	30
III.4 – Hormônios, Fatores de Crescimento e Outros Peptídeos:	31
III.5 – Inibidores de Fosfatase ou Protease:	31
III.6 - KITS:	32
III.7 – Drogas e Antibióticos:	32
III.8 - Soro e meio de cultura:	33
III.9 - Soluções:	33
III.10 - Isótopos radioativos:	35
III.11 - Enzimas:	35
III.12 - Oligonucleotídeos:	36
IV.2 – Carenciamento:	38
IV.3 - Extração de proteína total:	39
IV.4 - SDS-PAGE:	39
IV.7 - Transformação de Bactérias por Choque Térmico:	42
IV.8 - Preparação de DNA de Plasmídeos:	42

IV.9 - Extração de Fragmentos de Plasmídeos:	43
IV.10 - Sistema de Expressão Tet-On (Clontech):	43
IV.11 - Transfecção de Células:	44
IV.12 - Obtenção de clones que superexpressam ciclina D1:	45
IV.13 - Sistema Myc-ER:	46
IV.14 - Extração de RNA total e Northern blot:	47
IV.15 - Marcação de Sonda Radioativa:	47
IV.16 - Hibridização:	48
IV.17 - Ensaio de Entrada em S por Incorporação de BrdU:	48
IV.18 - Southern blot:	49
IV.19 - Sequenciamento:	50
IV.20 - HPLC:	50
V - RESULTADOS	51
V.1 - Obtenção de clones que superexpressam ciclina D1	52
V.2 - Sinalização por FGF-2 e ACTH	63
V.3 - Importância de ciclina D1 e c-Myc no controle do ciclo celular por ACTH	70
V.4 - Bloqueio do ciclo celular por ACTH ₁₋₃₉ :	73
V.6 - Busca de Peptídeos Ativos em Células Adrenais	85
VI - DISCUSSÃO	95
VII – CONCLUSÕES	100
VIII - REFERÊNCIAS	103
CURRICULUM VITAE	115

Este projeto foi financiado pela FAPESP e CNPq

SUMMARY

The main control of mammalian cell cycle, which is divided in G₀/G₁/S/G₂/M, occurs in G₀→G₁→S transition. In this work we show that cyclin D1 protein plays a key role in signal transduction circuits underlying the G₀→G₁→S transition of mouse Y-1 adrenocortical cell line. This conclusion is not surprising, once in the last years, many laboratories have contributed to establish the notion that the activity of the distinct forms of cyclin/CDK complexes is essential for the G₀→G₁→S transition, and also for other phases transition of cell cycle.

In Y-1 cells, FGF-2 causes a delayed (5-6h) induction of cyclin D1 gene and protein, through a process dependent on protein synthesis. Hypophisary peptides, not identified, as well as vasopressin, block cyclin D1 induction, antagonizing FGF-2. By this mechanism, vasopressin exert an anti-mitotic effect, blocking G₀→G₁→S transition promoted by FGF-2. ACTH, which also exhibit a strong anti-mitotic effect upon FGF-2, does not affect cyclin D1 induction. Double transfection of inducible c-Myc (MycER) and constitutive cyclin D1 cDNA, in the presence of ACTH, mimics the mitogenic action of FGF-2 in G₀ Y-1 cells. Altogether, these results show that, in adrenocortical cells, c-Fos, c-Jun, c-Myc and cyclin D1 act in an independent and complementary manner, being necessary for the G₀→G₁→S transition of cell cycle.

RESUMO

O principal controle do ciclo celular de mamíferos, que é dividido em G0/G1/S/G2/M, ocorre na transição G0→G1→S. Nesta tese mostramos que a proteína ciclina D1 desempenha um papel fundamental nos circuitos de transdução de sinais que regulam a transição G0→G1→S na linhagem Y-1 de células adrenocorticais de camundongo. Esta conclusão não é surpreendente, uma vez que, ao longo dos últimos anos, muitos laboratórios contribuíram para estabelecer a noção de que a atividade das diversas formas do complexo ciclina/CDK é essencial para a transição G0→G1→S, e também para outras etapas do ciclo celular.

Em células Y-1, FGF-2 induz tardiamente (5-6h) a expressão do gene e da proteína ciclina D1, através de um processo dependente de síntese de proteínas. Peptídeos hipofisários não identificados e vasopressina bloqueiam a indução de ciclina D1, antagonizando FGF-2. Por este mecanismo, vasopressina exerce um efeito anti-mitótico, bloqueando a transição G0→G1→S promovida por FGF-2. ACTH, que também exibe um forte efeito anti-mitótico sobre FGF-2 não afeta a indução de ciclina D1. A transfecção dupla de uma forma induzível de c-Myc (MycER) e constitutiva do cDNA de ciclina D1, em presença de ACTH mimetiza a ação mitogênica de FGF-2 em células Y-1 no estado G0. Estes resultados mostram que, em células adrenocorticais, c-Fos, c-Jun, c-Myc e ciclina D1 agem de forma independente e complementar, sendo necessários para a transição G0→G1→S do ciclo celular.

ABREVIATURAS

ACTH – adrenocorticotrophic hormone
Ang I, II – angiotensin I, II
AP-1 – activator protein 1
BrdU – bromodeoxyuridine
CAK – CDK activating kinase
cAMP – cyclic adenosin monophosphate
CDK – cyclin dependent kinase
CKI – cyclin dependent kinase inhibitor
CLIP – corticotropin-like intermediate peptide
CRE – cAMP responsive element
CREB – CRE binding protein
CRF – corticotropin releasing factor
DAB – diamino benzydine
DAG – diacylglycerol
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole
DME – Dulbecco's modified eagle
ECL – enhanced chemiluminescence
ECM – extracellular matrix
ER – estrogen receptor
ERKs – extracellular regulated kinases
FCS – fetal calf serum
FGF – fibroblast growth factor
FITC – fluorescein isothiocyanate
GAP – GTPase activating protein
GAPDH – glyceraldehyde phosphate dehidrogenase
GNEFs – guanine nucleotide exchange factors
GPCRs – G protein coupled receptors
HPLC – high performance liquid cromatography
HRP – horseradish peroxidase
HSPG - heparan sulfate proteoglycans
Ins-P₃ – inositol triphosphate
JNK – N-terminal Jun kinase
LB – Luria Bertani
LPH – lipotropin hormone
MAPKs – mitogen activated protein kinases
MSH – melanocyte stimulating hormone
4'-OH – 4' hidroxi tamoxifen

PAGE – polyacrylamide gel eletrophoresis
PDGF – platelet derived growth factor
PDK-1 phosphoinositide dependent kinase 1
PI3K – phosphatydil inositol-3 kinase
PtdIns-P₃ –phosphatydilinositol triphosphate
PKA – protein kinase A
PKC – protein kinase C
PLC – phospholipase C
PMA – phorbol-12 myristate-13 acetate
PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride
POMC – pro-opiomelacortin
pRb – retinoblastoma protein
PTEN - phosphatase and tensin homologue
RTKs – receptors tyrosine kinase
SAPK – stress activated protein kinase
TRE – tetracycline responsive element
TPA responsive element

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Ciclo Celular

O modelo atual do ciclo celular em células de mamíferos compreende quatro fases:

G1: (Gap 1) período de tempo entre o fim da última mitose e o início da próxima síntese de DNA;

S: (Síntese) período de tempo necessário à duplicação do DNA nuclear;

G2: (Gap 2) período de tempo entre a última fase S e o início da próxima mitose;

M: (mitose) período de duração da mitose ou divisão celular propriamente dita, que envolve a condensação dos cromossomos duplicados, separação das cromátides irmãs e segregação em duas células filhas (**figura 1**).

G1 é variável, enquanto S, G2 e M variam muito pouco com o tipo celular. A transição de fase para fase no ciclo celular é coordenada de maneira a assegurar que cada fase tenha sido completada antes de iniciar-se a seguinte. Esta coordenação é garantida por “checkpoints”, impedindo a entrada na fase S de células que não tenham duplicado seu DNA, assim como bloqueando o reinício da replicação quando o DNA já está duplicado. Danos ao DNA induzem eventos de “checkpoint” que impedem o disparo da entrada em S ou M até que haja reparo, impedindo a replicação do DNA danificado (para uma revisão ver Darnell et al, 1997).

A fase G0 é o período de tempo indeterminado em que a célula pode ficar em estado de quiescência, não havendo divisão celular nem duplicação do DNA. O controle principal do ciclo celular ocorre durante a transição G0→G1→S (Pardee, 1989).

Para que uma célula saia de G0 é necessário que ela receba estímulos extracelulares de fatores de crescimento, hormônios ou qualquer outro agente mitogênico. Estes fatores ligam-se a receptores específicos, desencadeando a transdução de sinal até o núcleo da célula, induzindo a transcrição dos genes de resposta primária, os "immediate early genes", independentemente de síntese proteica. Os produtos de alguns dos genes de resposta primária são fatores de transcrição, que irão mediar a transcrição dos genes de resposta secundária, dentre os quais encontram-se os genes que controlam a progressão de G1. Dentre os genes de resposta secundária encontram-se os genes de ciclinas, cuja expressão é imprescindível para a progressão do ciclo celular (Reddy, 1994; Sherr, 1995).

Figura 1: Modelo de ciclo celular de mamíferos: um conjunto de proteínas fundamentais na maquinaria que controla o ciclo celular é destacado. Entre estas proteínas algumas são estáveis (CDKs, Rb, E2F), tendo sua atividade funcional regulada. Outras (ciclinas, p15, p16, p21, p27) são proteínas de alto "turnover", diferencialmente expressas ao longo do ciclo. A fase mais variável em tempo é a fase G1, sendo portanto mais crítica no controle do ciclo celular. R representa um ponto no fim de G1, além do qual o processo se torna irreversível. Este esquema inclui a saída reversível do ciclo para G0, mas omite duas saídas irreversíveis da maior importância biológica: apoptose e diferenciação, que não são objetos de estudo nesta tese.

1.2 - Vias de Transdução de Sinal

A via de Ras

A família dos genes *ras*, em mamíferos, que é composta por três membros ,H-, K-, e N-*ras*, codifica para proteínas de 21kDa que apresentam alta homologia entre si, cerca de 80% (Barbacid, 1987; Macara et al, 1996). As diferenças entre as proteínas encontram-se principalmente na região C-terminal. Existem quatro isoformas da proteína Ras: Ha-Ras, N-*ras*, Ki-*ras*4A e Ki-*ras*4B. Elas são produtos dos três genes, com Ki-*ras*4A e Ki-*ras*4B sendo formas variantes de “splice” do mesmo gene (Zhang et al, 1997).

Estas proteínas são GTPases e se encontram associadas à parte interna da membrana plasmática, onde transmitem o estímulo iniciado por um ligante extracelular, para as vias de transdução de sinal citoplasmáticas que controlam o crescimento celular, a diferenciação e apoptose (Campbell et al, 1998).

A atividade bioquímica das proteínas Ras é controlada pela troca entre GTP e GDP. O controle celular das formas GTP/GDP-ligadas é modulado por dois tipos de proteínas regulatórias. Fatores de Troca de Nucleotídeos (GEFs: Ras GRF/mCD25, SOS1/2) promovem a formação do estado ativo, ligado a GTP; e Proteínas Ativadoras de GTPase (GAPs: p120 GAP, NF1-GAP/neurofibromina) promovem a formação do estado inativo, ligado a GDP (Boguski et al, 1993). Formas mutadas dos genes *ras* constitutivamente no estado ativado (GTP-ligado) estão presentes em uma fração significativa de tumores humanos. Existem amplas evidências que os genes Ras estão envolvidos no controle da proliferação celular. A proteína Ras é o ponto de convergência para muitas vias de sinalização (Vojtek et al, 1998; Avruch et

al, 1994). Proteínas Ras são ativadas, transientemente, em resposta a sinais extracelulares, como fatores de crescimento, citocinas, hormônios e neurotransmissores. Uma das vias regulatórias que envolve a participação da proteína Ras melhor conhecida é aquela que compreende Ras-Raf1-Mek-Erk/MAPK, acionada por receptores de tirosina quinase (RTKs) (Campbell et al, 1998).

Receptores de Tirosina Quinase (RTKs)

A ligação de fatores de crescimento aos RTKs resulta em dimerização e autofosforilação em resíduos de Tyr, que possibilita ligação da proteína adaptadora Grb2. A ligação de Grb2 recruta a proteína Sos1, que ativa Ras por ser um fator de troca de nucleotídeos GDP/GTP. A ativação de Ras inicia uma cascata de reações de fosforilação que começa na ativação de Raf e termina nas MAPKs (Mitogen activated protein kinases) p44 e p42, que também são conhecidas como ERK1 e 2 (Extracellular signal regulated kinases) (Bos et al, 1995; McMahon et al, 1997). A ativação destas proteínas quinase citoplasmáticas resulta na sua migração para o núcleo e na fosforilação de fatores de transcrição nucleares (por exemplo Elk-1 da família Elk/SAP, Coffey et al, 1994), que vão ativar a transcrição de genes de resposta primária, como por exemplo *c-fos* e *c-jun* (**figura 2**). As proteínas Fos e Jun formam dímeros Jun-Jun ou Fos-Jun, formando o conjunto de homô e heterodímeros que compõe o complexo AP-1 (Activator protein-1), atuando como fator de transcrição em promotores de diversos genes de resposta secundária (Ryder et al, 1988). Outro gene de resposta primária, *c-myc*, tem

como produto a proteína c-Myc, também um componente de fator de transcrição que dimeriza com a proteína Max e ativa a transcrição de vários genes de resposta secundária (Vlach J et al, 1996). Dentre estes genes de resposta secundária encontram-se os genes de ciclinas, que codificam proteínas importantes para o controle do ciclo celular. A ativação de ERKs é apenas um dos mecanismos da sinalização por Ras. Outras proteínas, Ras-GAPs, PI3K, GNEFs, PKC-zeta, MEKK-1, são candidatas a intermediários da via de Ras (Adari et al, 1988; van Aelst et al, 1993; Rodriguez et al, 1994; Hofer et al, 1994; Russel et al, 1995; Diaz-Meco et al, 1994).

Via de receptores acoplados a proteína G

Os receptores de sete hélices transmembranares acoplados a proteínas G compõe uma vasta família de receptores de hormônios clássicos, como adrenalina, TSH e ACTH, e também de receptores cujos ligantes ainda não são conhecidos. Proteínas G são proteínas com atividade GTPásica, interconvertendo-se entre a forma inativa ligada a GDP ou a forma ativa ligada a GTP. Consistem de três subunidades, α de 45 kDa, β de 35 kDa e γ de 7 kDa. A subunidade α é responsável pela ligação a guanina e as subunidades β e γ ligam-se covalentemente associando-se mais fortemente com a membrana. A ligação do hormônio a um receptor de sete hélices transmembranares catalisa a troca de GDP por GTP, ativando a adenilato ciclase, processo que ocorre na membrana plasmática. A subunidade α dissocia-se da subunidade $\beta\gamma$ e ativa a adenilato ciclase. A descoberta deste processo, historicamente, levou à criação do primeiro paradigma de

transdução de sinal através da membrana (Schramm & Selinger, 1984). Neste processo de sinalização muitas subunidades G_{α} -GTP e unidades catalíticas de adenilato ciclase são ativadas a partir de uma molécula de hormônio. Assim, relativamente poucos receptores são acionados, levando à geração de grandes quantidades de cAMP, resultando em uma amplificação de sinal. O cAMP gerado a partir de ATP estimula a proteína quinase dependente de cAMP, PKA (**figura 2**). Proteínas G hidrolisam o GTP ligado e assim catalisam sua própria inativação (para uma revisão ver Heldin & Purton, 1996; Stryer, 1996).

Figura 2: Vias de sinalização por receptores tirosina quinase (RTKs) e receptores acoplados a proteína G (GPCRs).

Via de PKA

A proteína quinase dependente de cAMP (PKA) é ativada por concentrações muito baixas de cAMP, da ordem de 10^{-8} M. É formada por duas subunidades catalíticas (C) de 38kDa e duas subunidades regulatórias (R) de 49kDa. Na forma não ativa, estas subunidades formam um complexo R_2C_2 e após ligação de cAMP as subunidades C dissociam-se das subunidades R, fosforilando resíduos específicos de Ser/Thr em diversos substratos (Uhler & McKnight, 1987). As fosforilações catalisadas por PKA são revertidas por fosfatases que têm especificidades diferentes para cada substrato (para uma revisão ver Heldin & Purton, 1996).

Existem duas grandes classes de isoformas da subunidade R, RI e RII, que apresentam alta homologia entre si. A expressão de cada uma destas isoformas varia em espécies e tecidos, e elas formam complexos com as mesmas isoformas da subunidade C ($C\alpha$, $C\beta$ e $C\gamma$). A ativação de cada isoforma parece ser peculiar a cada tipo de resposta fisiológica. Níveis elevados de cAMP intracelular provocam fosforilação de múltiplos substratos citoplasmáticos e também a translocação da subunidade C para o núcleo, ativando a transcrição de diversos genes. Um substrato nuclear de PKA é o fator de transcrição CREB, que reconhece elementos denominados CRE (cAMP responsive element) presentes nos promotores de muitos genes, dentre eles *c-fos* (Hagiwara et al, 1993).

Via de PKC

Uma outra classe de proteínas quinase dependentes de segundos mensageiros é a proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídeos (PKC). A ativação de PKC ocorre por diacilglicerol (DAG) ou agentes que mimetizam seus efeitos, como o éster de forbol PMA (Phorbol-12 Myristate-13 Acetate). Fatores que agem via receptores de tirosina quinase e receptores acoplados a proteínas G desencadeiam a produção de DAG na célula. Uma fosfolipase específica, PLC- γ , é responsável pela hidrólise de Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PtdIns 4,5-P₂), produzindo dois segundos mensageiros intracelulares importantes: inositol 1,4,5 trifosfato (Ins 1,4,5-P₃), que induz a liberação de íons Ca²⁺, e DAG, que ativa PKC. Fatores de crescimento polipeptídicos, como PDGF e FGF, ao se ligarem aos respectivos receptores, promovem sua associação com PLC- γ , ativando-a através de fosforilação de resíduos de tirosina, o que estimula o "turnover" de PtdIns (4,5-P₂) (Nishizuka, 1984).

Via de PI3K

A ativação de RTKs (receptor tyrosine kinases) por fatores de crescimento ativa rapidamente a via de PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase), que consiste de uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade regulatória p85 (Vanhaesebroeck et al, 1997). A atividade enzimática depende da ligação de p110 a p85, gerando segundos mensageiros fosfoinositídeos (Hawkins et al, 1992). A ativação de PI3K é fundamental para a entrada em S em um

grande número de tipos celulares, e ativa muitas proteínas, dentre elas Akt/PKB (Bos, 1995). Por muito tempo acreditou-se que a sinalização por fosfatidilinositol (PtdIns) e seus derivados fosforilados ocorria somente através de sua hidrólise por fosfolipase C (PLC), gerando intermediários como inositol 1,4,5 trifosfato (ins 1,4,5-P₃) e diacilglicerol (DAG), que ativam a via de PKC. Recentemente, devido a descoberta de PI3K, estes conceitos foram modificados. Sabe-se que a ativação de PKC ocorre não só por interação com DAG, mas também pela interação com os produtos de PI3K (PtdIns-fosfatos). Esses produtos ativam as quinases dependentes de fosfoinositídeos (PDKs), responsáveis pela fosforilação e ativação de muitas proteínas quinases, como Akt/PKB e PKC. A desativação de PDK-1 ocorre por PTEN, que causa desfosforilação de PtdIns-fosfatos (Krasilnikov, 1999; Scheid & Woodgett, 2001).

Ciclinas e CDKs

Ciclinas são proteínas regulatórias de alto "turnover" que apresentam massa molecular relativa entre 30 e 55 kDa, e ativam subunidades catalíticas CDKs (cyclin dependent kinases), de aproximadamente 35 a 40 kDa, que são proteínas de longa vida média. No complexo ciclina-CDK, a regulação da atividade da subunidade CDK é dependente de fosforilação em resíduos específicos de Ser e Thr pelo complexo CAK (CDK activating kinase), formado por ciclina H/CDK7.

A atividade dos complexos ciclina-CDK, que apresentam atividade Ser/Thr quinásica, é de grande importância no controle do ciclo celular.

Dessa forma, a associação de CDK4 ou CDK6 com ciclinas D é essencial na progressão de G1, enquanto ciclina E/CDK2 é importante na transição G1→S. Ciclina A e ciclina B, que encontram-se ambas complexadas com CDK2, estão envolvidas nas fases G2 e M.

Ciclinas apresentam uma região de alta homologia constituída de cerca de 100 aminoácidos, denominada "cyclin box". CDKs apresentam alta homologia entre si, cerca de 75%, e possuem um "core" catalítico de 300 aminoácidos, comum a todas as proteínas quinase de eucariotos (Jeffrey et al, 1995).

Os genes de ciclinas D são induzidos por c-Myc (Perez-Roger et al, 1999), AP-1 (Bakiri et al, 2000) e NF-κB (Guttridge et al, 1999). Dependendo da composição de AP-1 o gene de ciclina D1 é induzido ou reprimido: c-Jun induz a transcrição, enquanto Jun-B reprime. Dessa maneira, a variação da razão entre c-Jun e Jun-B, assim como sua fosforilação, são críticas na regulação da expressão de ciclina D1 durante G1 (Bakiri et al, 2000).

A ligação de inibidores é um outro modo de regulação da atividade dos complexos ciclina/CDK. Inibidores de CDKs são proteínas de baixo peso molecular que foram divididas em duas classes segundo a homologia de sequência primária e o modo de ação. A classe KIP inclui as proteínas p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, que se ligam aos complexos ciclina/CDK. A classe INK inclui p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}, que se ligam a CDK4 e 6 interferindo na interação de ciclina com CDK (Hall, 1995; Morgan, 1995).

Superexpressão de ciclina D1 em fibroblastos causa um encurtamento de G1 e leva a um aumento nos níveis de ciclina E e a uma diminuição nos

níveis de p21^{WAF1} e p27^{KIP1} (Weinstein et al, 1997). Sabe-se também que mutantes que superexpressam D1 fazem um "bypass" no bloqueio causado por altos níveis de cAMP intracelular (L'Allemain et al, 1997).

Regulação do ciclo celular por E2Fs

Existem fortes evidências de que diversas vias de sinalização, como por exemplo a via de RTK (Receptor Tyrosine Kinase) e a via de receptores acoplados a proteína G, convergem para a ativação do complexo ciclina D/CDK4, 6 para que ocorra fosforilação de pRb e indução da fase S. Isto apoia a idéia de que ciclina D/CDK4/pRb têm um papel importante no "checkpoint" de G1 (Bartek et al, 1996; Cooper et al, 1997).

A proteína pRb no seu estado hipofosforilado, encontra-se ligada à família de fatores de transcrição E2F. Após fosforilação em resíduos específicos de Ser e Thr, pRb libera E2Fs, que vão mediar a transcrição de outros genes de resposta secundária. A família de fatores de transcrição E2F compreende cinco membros de proteínas relacionadas (E2F-1 a E2F-5) e um conjunto de proteínas pertencentes à família de fatores de transcrição DP. Deste modo, heterodímeros de proteínas destas duas famílias formam complexos que se ligam a determinadas sequências do DNA, tendo importante papel na regulação de G1 (a-Weinberg, 1996). O promotor do gene de ciclina E, cuja expressão é crítica na transição G1→S, apresenta três sítios de ligação a E2F, o que sugere que a regulação da transcrição de ciclina E seja mediada por E2F (b-Weinberg et al, 1996). As proteínas p107 e p130, relacionadas a pRb, também podem ser fosforiladas (a-Weinberg, 1996). A

proteína pRb encontra-se ligada a E2Fs 1, 2 e 3, enquanto p107 e p130 associam-se com E2Fs 4 e 5. O mecanismo do controle da transição G1→S consiste de um "feedback" positivo após fosforilação de pRb por ciclina D/CDK4,6. A liberação de E2Fs induz a transcrição de ciclina E, cujo produto vai se associar com CDK2, formando o complexo ciclina E/CDK2 que fosforila pRb, assegurando a contínua fosforilação dessa proteína no final de G1 (Weinberg, 1995).

I.3 - Fatores de Crescimento e Hormônios

Peptídeos derivados de POMC

O gene de POMC (pró-opiomelancortina) é transcrito nos corticotrofos da hipófise anterior, e também é expresso no lobo intermediário. Na hipófise anterior, POMC, uma glicoproteína de 32 kDa, é processada em peptídeos de alto peso molecular (ACTH, β -LPH e β -endorfina) e de baixo peso molecular (α , γ e β -endorfinas e α , β e γ_3 -MSH) (Houben et al, 1994) (**figura 3**). O hormônio peptídico ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) consiste de 39 aminoácidos, dos quais apenas 23 da região N-terminal são importantes para ligação ao receptor e desencadeamento da resposta ao hormônio. Sua secreção é fundamental para crescimento e manutenção da adrenocórtex. O padrão de secreção de ACTH ocorre em pulsos, sendo que o pico aparece nas 2 últimas horas do período de sono. Liga-se a um receptor de sete hélices transmembranares que atua via proteína G, ativando adenilato ciclase, aumentando os níveis de cAMP intracelular, atingindo um efeito máximo em

aproximadamente 3 minutos. A estrutura do receptor apresenta 85% de homologia com o receptor de MSH, e a clonagem e sequenciamento do mesmo só foi feita na década de 90, enquanto que a estrutura primária do hormônio foi descrita nas décadas de 50-60. O receptor é uma proteína de 297 resíduos de aminoácidos, incluindo sete segmentos hidrofóbicos que constituem os domínios transmembranares, dois sítios de glicosilação na região N-terminal e sequências de fosforilação por PKA, PKC e caseína quinase II. A falta ou excesso deste hormônio são a causa de diversas doenças relacionadas a glicemia e ao balanço hídrico e eletrolítico do organismo, que são controlados por hormônios esteróides. (Mountjoy et al. 1992, Guyton, 1989).

Figura 3: Processamento de POMC na hipófise anterior. Após clivagem diversos peptídeos são liberados, dentre eles ACTH, β -LPH, β -endorfina (peptídeos de alto peso molecular) e α , γ e β -endorfinas, α , β e γ_3 -MSH (peptídeos de baixo peso molecular). Os números representam os sítios de clivagem proteolítica.

Angiotensina I e II

Angiotensina II é um peptídeo de oito aminoácidos que se liga a receptores do tipo GPCRs presentes em células do rim, músculo, e adrenal (Clapham, 1995). Angiotensina II é liberada a partir da clivagem de Angiotensina I. Angiotensina I é liberada através da hidrólise de globulinas plasmáticas por renina. O sistema renina-angiotensina está envolvido na regulação do balanço hídrico/eletrolítico, controlando o balanço de sódio, volume de fluido e pressão sanguíneas, através de liberação de renina pelo rim. Em humanos, o sistema renina-angiotensina localiza-se também em lactotrofos da hipófise (Bigorgne et al, 1986). Já em ratos, a maior parte dos componentes do sistema são encontrados em gonadotrofos. Angiotensina II ativa PLC, liberando IP₃ e DAG a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato e levando à liberação de Ca²⁺. AngII desencadeia fosforilação de muitas proteínas quinases intracelulares ERKs, SAPKs e Jun N-terminal quinases (Marrero et al, 1994; Zohn et al, 1995).

Oxitocina e Vasopressina

São hormônios neurohipofisários de 9 aminoácidos presentes na hipófise anterior, que apresentam estruturas muito similares. Em humanos e ratos demonstrou-se que em células adrenais há expressão e liberação de vasopressina. Vasopressina é um hormônio antidiurético e controla a reabsorção de água, constrição dos vasos sanguíneos, gliconeogênese, secreção de AngII pela glândula adrenal e também apresenta funções cerebrais. Oxitocina induz contração do miométrio, produção de

prostaglandinas e produção de leite (Houben et al, 1994). Os receptores de vasopressina e oxitocina pertencem a superfamília de GPCRs e formam uma sub-família de receptores de três tipos: V1a, V1b e V2. Receptores do tipo V2 atuam via PKA e estão envolvidos na reabsorção de água desencadeada por vasopressina, enquanto que as outras funções do hormônio são desencadeadas através de receptores V1a, que ativam a via de PKC (Birnbaumer, 2000). Todavia verificou-se que receptores tipo V1a e V2 podem ter efeitos sinérgicos em relação ao acúmulo de cAMP (Klingler et al, 1998). Na glândula adrenal foram detectados receptores do tipo V1a na córtex e receptores dos tipos V1a/b na medula (Guillon et al, 1998). Tratamentos com vasopressina levam à ativação de c-Src por PKC em células mesangiais (Ghosh et al, 2001).

FGFs (Fibroblast Growth Factors)

FGFs (fibroblast growth factors) são polipeptídeos com várias funções, como o desenvolvimento embrionário, regulando proliferação, migração e diferenciação celular. Alguns tipos de FGFs estão envolvidos na transdução de sinal neuronal no sistema nervoso central e periférico de adultos. São encontrados em diversos organismos, invertebrados e vertebrados, e interessante também em vírus. Em vertebrados já foram identificados 22 membros da família de FGFs, com massas moleculares entre 17 e 34 kDa e apresentando 13 a 71% de identidade na sequência de aminoácidos. Os genes que codificam para FGFs contêm 3 exons, e o tamanho da sequência codificadora varia de cerca de 500 kb a 100 kb. Em alguns *fgf(s)*, o exon 1 é

subdividido em 2 e 4 subexons por "splicing" alternativo. A maioria dos FGFs tem uma sequência sinal para secreção localizada na região N-terminal. FGF-1 e FGF-2 não têm sequência sinal e não são secretados, mas podem ser encontrados na superfície celular e na matriz extracelular (ECM). Alguns FGFs possuem sequência sinal para localização nuclear. Todavia, a função biológica dos FGFs nucleares ainda não foi identificada. Os padrões e tempos de expressão dos 22 membros da família variam dependendo da etapa do desenvolvimento. Os receptores de FGFs (FGFRs) possuem 3 domínios imunoglobulina-like e uma sequência de ligação a heparina. Após ligação de FGFs, os receptores do tipo tirosina quinase dimerizam e se auto-fosforilam, desencadeando uma cascata de fosforilação que vai resultar na transcrição dos genes de resposta primária no núcleo. Uma característica dos FGFs é a interação com heparina ou HSPG (heparan sulfate proteoglycans). As regiões de FGFs envolvidas na ligação ao receptor são distintas daquelas que se ligam à heparina. Estas interações entre FGFs e heparina estabilizam os FGFs protegendo da desnaturação térmica e degradação proteolítica. Além disso, heparina é necessária para a ativação dos FGFRs por FGFs (para uma revisão ver Ornitz et al 2001).

I.4 - A linhagem Y-1

A linhagem celular Y-1 foi isolada de tumor funcional de córtex adrenal de camundongo (Yasumura et al, 1966). É um modelo experimental conveniente para o estudo das respostas a ACTH porque apesar das alterações, como amplificação do proto-oncogene *c-k1-Ras* e expressão

desregulada *de c-myc*, possui um controle remanescente que permite respostas a ACTH como se fosse uma célula adrenal normal (Schimmer, 1981). As respostas são: arredondamento celular, aumento na síntese de hormônios esteróides, indução da transição $G0 \rightarrow G1$, bloqueio em $G1$, indução dos proto-oncogenes *fos* e *jun* e inibição de *c-myc*. ACTH tem um efeito dual no controle do ciclo celular de células Y-1, dependendo do tempo de tratamento. Tratamentos curtos, até 2h, estimulam a transição $G0 \rightarrow G1$ em células carenciadas enquanto tratamentos longos, maiores que 4h, bloqueiam a transição $G1 \rightarrow S$ (Armelin et al, 1977; Armelin et al, 1996; Kimura et al, 1983; Kimura & Armelin, 1988; Kimura et al, 1993). O efeito estimulatório parece ser independente de PKA, enquanto o efeito inibitório é totalmente dependente de PKA (Lotfi et al, 1997).

II - RELEVÂNCIA E OBJETIVOS

A partir de 1995 progressivamente, através de resultados de diversos laboratórios, chegou-se a um esquema mínimo (**fig. 4**) para o controle da transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$:

Figura 4: mecanismos de disparo do ciclo celular após estímulo por fatores de crescimento e hormônios.

Os componentes e as reações desse esquema são alvos potenciais dos agentes regulatórios do ciclo celular. A partir desse esquema é possível definir abordagens para: a) elucidar os mecanismos de ação de mitógenos e antimitógenos conhecidos, (*e.g.* FGF-2 e ACTH respectivamente); b) buscar novos agentes reguladores do ciclo celular, como peptídeos conhecidos ou extratos de glândulas e tecidos.

Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que ACTH pode bloquear o ciclo celular de células adrenais Y-1 em tratamentos longos ou funcionar como um mitógeno fraco em tratamentos curtos. O bloqueio do ciclo celular de células Y-1 por ACTH tem como principal causa a diminuição nos níveis da proteína c-Myc. Tratamentos curtos com ACTH tem

um efeito mitogênico, induzindo fosforilação de ERK 1,2, expressão do gene *c-fos* e estimulando a entrada em S. FGF-2 tem forte efeito mitogênico sobre células Y-1, induzindo a fosforilação de ERK 1,2 e a expressão de c-Fos e c-Myc. Além disso tem forte efeito na indução da entrada em S.

Nesta tese, o objetivo principal foi definir a regulação de ciclina D1 como alvo de mitógenos e antimitógenos em células Y-1. Alguns objetivos específicos foram:

- 1 – obter construções que superexpressam ciclina D1, utilizando sistemas de expressão induzíveis ou constitutivos. Estas construções foram utilizados para transfectar células Y-1 em experimentos de entrada em S.
- 2 – fracionar a preparação de corticotropina A, para determinar o(s) componente(s) ativo(s) em células Y-1.
- 3 – encontrar peptídeos hipofisários ou não que apresentem atividade biológica em células adrenais.

III - MATERIAIS

III.1 - Linhagem Celular Y-1:

A linhagem celular Y-1 (Yasumura et al, 1966) é derivada de tumor funcional de adrenocórtex de camundongo e é mantida congelada em nitrogênio líquido. A linhagem utilizada no laboratório é a sublinhagem HSR, obtida da ATCC (American Type Culture Collection).

III.2 - Plasmídeos:

pcBZ054 - pBluescript SK⁺ contendo o cDNA de ciclina D1 de camundongo, de 1,3 kb (Prof. C.J. Sherr, Howard Hughes Medical Institute, Saint Jude Children's Research Hospital, Department of Tumor Cell Biology, Memphis, TN)

pTRE – plasmídeo onde foi subclonado o cDNA de ciclina D1 (**Clontech**)

pTKHyg – plasmídeo contendo o gene de resistência a higromicina (**Clontech**)

pTet-On – plasmídeo responsável pela indução do vetor de expressão (**Clontech**)

pSV2 - plasmídeo que contém o gene de resistência a ampicilina

pSVK3D1 - construção contendo a sequência codificadora de ciclina D1

pTet3MTRED1H3 - construção de cDNA de ciclina D1 clonado no plasmídeo TRE

pMyc-ER - plasmídeo pBabe puromicina, contém a fusão c-myc/receptor de estrógeno clonada no sítio EcoRI (Littlewood et al, 1995). Construção cedida pelo Prof. Robert Eisenman, Fred Hutchinson Cancer Research Center -

Seattle, WA e originariamente feita no laboratório do Prof. Gerard Evan, Imperial Cancer Research Fund.

pGAPDH – pBluescript SK⁺ contendo o fragmento de 325 bp do cDNA de GAPDH de camundongo.

III.3 - Anticorpos:

Anti ciclina D1 policlonal - Santa Cruz

Anti-p27 policlonal - Santa Cruz

Anti c-Fos policlonal - Santa Cruz

Anti c-Myc policlonal - Santa Cruz

Anti ER- α - Santa Cruz

Anti ERK 1,2 total - New England Biolabs

Anti ERK 1,2 fosforilada - New England Biolabs

Anti mouse IgG e Anti rabbit IgG conjugados com peroxidase - Amersham Pharmacia

Anti mouse IgG conjugado com FITC (fluorescein isothiocyanite) - Sigma

Anti-bromodeoxiuridina monoclonal - Amersham Pharmacia

III.4 – Hormônios, Fatores de Crescimento e Outros Peptídeos:

Corticotropina A - extraída de hipófise suína (**Sigma**). Solução estoque 100U/ml

ACTH 1-39 – peptídeo sintetizado na Escola Paulista de Medicina (**EPM**) ou **Sigma**

FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) – proteína recombinante produzida pelo laboratório do Prof. Angelo Gambarini. Solução estoque 1 mg/ml

Vasopressina - sintetizada na **EPM** ou **Sigma**

Oxytocina - **Sigma**

Angiotensina I- **Sigma**

Angiotensina II - **Sigma**

α -MSH - α -melanocyte stimulating hormone - **Sigma**

β -MSH - β -melanocyte stimulating hormone - **Sigma**

Bombesina - **Sigma**

CRF (Corticotropin Releasing Factor) - **Sigma**

CLIP (Corticotropin-like Intermediate Peptide) - **Sigma**

III.5 – Inibidores de Fosfatase ou Protease:

Ortovanadato de sódio – solução estoque 100mM em água bidestilada

Aprotinina – solução estoque 1mg/ml em 0,01M HEPES pH 7,0

Pepstatina – solução estoque 1mg/ml em etanol absoluto

PMSF – solução estoque 1mg/ml em isopropanol

III.6 - KITS:

Ready To Go T4 DNA Ligase - (Amersham Pharmacia) - reações de ligação

Gene Porter 2 - (Gene Therapy Systems) - transfecção em células de mamíferos

ECL Western blotting (Amersham Pharmacia) - Western blot

Anti-rabbit IgG ABC kit Vectastain (Vector Laboratories, Inc.) –
Imunocitoquímica

Luciferase Reporter assay (Promega) – ensaio de atividade de luciferase em clones Tet-On

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia) -
sequenciamento

QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) – mini-prep de plasmídeos

III.7 – Drogas e Antibióticos:

PD98059 (New England Biolabs)- solução estoque 20 mM em DMSO,
inibidor de MEK 1

Wortmanina (Sigma)- solução estoque 200 μ M em DMSO, inibidor de PI3K

Cicloheximida (Sigma) – solução estoque 1 mg/ml em etanol, inibidor de
síntese proteica

Doxiciclina (Sigma) – solução estoque 1 mg/ml em etanol, indutor do sistema
Tet-On

4'OH Tamoxifen (Sigma) - solução 10 μ M em etanol, indutor do sistema
MycER

BrdU (Amersham Pharmacia) – bromodeoxiuridina, solução estoque 10 mM, ensaio de entrada em S

DAB tablets (Sigma) – 3,3'diaminobenzidina, detecção de reação de peroxidase em imunocitoquímica

DAPI (Sigma) – 4',6-diamidino-2-phenylindole, solução estoque 5µg/ml, coloração total de núcleos em ensaio de incorporação de BrdU

Ampicilina (Sigma) - solução estoque 100 mg/ml em água, seleção de bactérias transformadas

Geneticina (Gibco)- solução estoque 100 mg/ml em água, seleção de clones de células de mamíferos

Higromicina (Gibco)- solução estoque 50 mg/ml em água, seleção de clones de células de mamíferos

III.8 - Soro e meio de cultura:

DME - Dullbeco's Modified Eagle Medim (Sigma)

FCS - Fetal Calf Serum (Cultilab)

III.9 - Soluções:

Tripsina – 1L diluente de tripsina (8,2g NaCl, 0,2g KCl, 1,14g Na₂HPO₄, 0,2g KH₂PO₄, 0,29g Na₂EDTA), 1,5 ml vermelho de fenol 1%, 1g tripsina

PBS - KCl 2,7mM, NaCl 137mM, Na₂HPO₄ anidro 8mM, 1,5mM CaCl₂.2H₂O 0,68mM e MgCl₂.6H₂O 0,49mM (pH 7,2)

PBSA - NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ anidro 8mM e KH₂PO₄ 1,5mM (pH 7,2)

MOPS (5X) – 200mM MOPS, 50mM NaAc, 5mM EDTA, pH7,0

SSPE (20X) – 3M NaCl, 195mM NaH₂PO₄, 20mM EDTA, pH 7,4

SSC (20X) – 3M NaCl, 300 mM citrato de sódio, pH 7,0

Tampão de amostra para RNA – 10% formaldeído, 50% formamida, 10% glicerol, 2mM EDTA, 0,025% azul de bromofenol, 0,025% xileno cianol, 1X MOPS

TBE (5X) – 450mM Tris-borato, 10mM EDTA, pH8,0

Solução desnaturante I de DNA – 0,15M HCl

Solução desnaturante II de DNA - 0,5M NaOH, 1,5M NaCl

Solução neutralizante de DNA – 1M Tris-HCl, 1,5M NaCl, pH 7,0

Tampão de amostra para DNA (5X) - 50% glicerol, 1mM EDTA, 0,125% azul de bromofenol, 0,125% xileno cianol

Solução de pré hibridização – 50% formamida, 5X Denhardt (ficoll 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1%, BSA 0,1%), 5X SSPE, 0,1% SDS, 50µg DNA de esperma de salmão (desnaturado a 100°C)

Solução de hibridização – idem a solução de pré hibridização adicionado de 5% sulfato de dextrana

2 X Tampão de Amostra de SDS-PAGE - Tris.Cl 100mM, ditiotreititol 200mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%

Tampão de Transferência para Proteína - glicina 39mM, Tris base 48mM, SDS 0,037%, metanol 20%

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

Tampão NP-40 - 1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 135 mM NaCl, 20 mM Tris.Cl pH 8,0, 1 mM ortovanadato de sódio, 2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml pepstatina

Tampão de lise MAPK - 62,5 mM Tris-HCl (pH6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT, 0,1% azul de bromofenol

Tampão de corrida para SDS-PAGE - 25 mM Tris-base, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3

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

III.10 - Isótopos radioativos:

^{32}P α -dCTP

III.11 - Enzimas:

Eco RI (Gibco)

Hinc III (Gibco)

Acc I (Gibco)

Large T fragment DNA polimerase (Gibco)

Thermo Sequenase II DNA polimerase (Amersham/Pharmacia)

III.12 - Oligonucleotídeos:

cyc D1 sense: (441 a 460 da sequência codificadora)

5' TGG ACC GCT TCC TGT CCC TG 3'

cyc D1 antisense: (911 a 930 da sequência codificadora)

5' TGG CAG GCA CGG AGG CAG TC 3'

IV - MÉTODOS

IV.1 - Cultura de Células:

O estoque de células é mantido congelado em nitrogênio líquido. Após descongelamento, as células são mantidas em cultura em garrafas ou placas de poliestireno em meio DME acrescido de 10% de soro fetal bovino em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Ao DME são adicionados 1,2 g de bicarbonato de sódio, 25 mg/l ampicilina e 100 mg/l de sulfato de estreptomicina..

A troca do meio é feita a cada 3 dias e, no caso de subcultivo, o meio é aspirado, as células são lavadas com PBSA e tripsinizadas. Quando estiverem soltas são ressuspensas em DME com soro e a suspensão é distribuída em várias placas ou garrafas.

IV.2 - Carenciamento

As células são mantidas em cultura até atingirem subconfluência. Lava-se as células 2 vezes com PBS e 1 vez com DME, para eliminar qualquer traço de soro e, para células Y-1, adiciona-se DME sem soro fetal bovino. No caso de fibroblastos A-31, adiciona-se DME 0,5% soro. A adição de drogas ou fatores de crescimento utilizados nos experimentos é feita após 48h de carenciamento para células Y-1 e 24h para células A-31.

IV.3 - Extração de proteína total

As células são lavadas 2 vezes com PBS gelado e então adiciona-se 0,5 ml de tampão de lise NP-40 1% e ortovanadato de sódio por placa P100, acrescido de inibidores de protease que devem ser adicionados somente na hora da lise. As placas são mantidas no gelo durante 20 min., até que as células comecem a soltar. Raspa-se as placas com um policial e centrifuga-se a 10.000 rpm por 15 min. O sobrenadante é distribuído em eppendorfs em alíquotas de 100 µl, que são guardadas em freezer a - 80°C. Reserva-se uma alíquota de 20 µl para dosagem de proteínas. Faz-se a dosagem de proteína total utilizando-se o reagente de Bradford (BioRad).

IV.4 - SDS-PAGE:

Toma-se 100µg de proteína total e adiciona-se 1X (V/V) tampão de amostra para proteína 4X. A seguir ferve-se as proteínas por 10 min. As proteínas são resolvidas em gel de poliacrilamida a 35-50 mA "overnight".

IV.5 - Western blot:

Faz-se a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C **Amersham Pharmacia**) aplicando-se 23V, 500mA e 50W por 1h em cuba de transferência "semi-seca" (**BioRad**). A membrana é corada com Ponceau para verificação da eficiência da transferência. A membrana é

bloqueada em 20 ml de TBST/5% leite em pó desnatado por 45 min. à temperatura ambiente. Faz-se três lavagens com TBST e incuba-se com o anticorpo primário diluído 1:800 em TBST por 2h. Lava-se a membrana três vezes novamente com TBST e incuba-se com o anticorpo secundário HRP (Horseradish Peroxidase) diluído 1:1000 em TBST por 50 min. Após três lavagens faz-se a detecção com o kit *ECL* (Enhanced Chemiluminescence). O princípio da reação de quimioluminescência é a oxidação do luminol, catalisada por HRP/H₂O₂ em meio alcalino. Após a oxidação o luminol encontra-se no estado excitado e decai para o estado fundamental por uma via de emissão de luz. ECL é feita pela reação de oxidação do luminol em presença de amplificadores, 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 5s a 2 min. Dependendo do anticorpo primário utilizado, faz-se diluições maiores ou menores e o tempo de exposição é variável, de modo a resultar em um melhor sinal.

IV.6 - Ensaio de Imunocitoquímica:

A reação de imunocitoquímica é uma reação enzimática de peroxidase. Utiliza-se para esse tipo de reação um anticorpo primário, seguido de um anticorpo secundário biotinilado e de um complexo avidina/HRP-biotina. O sistema avidina biotina é amplamente utilizado porque avidina tem quatro sítios de ligação a biotina, e a maioria das proteínas pode ser conjugada com biotina. As células são plaqueadas em lamínulas redondas, cerca de 1×10^5 células/cm², em DME 10% FCS e carenciadas para soro por 48h. Após tratamentos as células são lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 3,7% por 20 min. e lavadas 3 vezes com PBSA. A seguir faz-se a permeabilização das células com solução de NP-40 1% em PBSA por 20 min, invertendo-se as lamínulas sobre 40µl de solução de detergente.. A seguir as lamínulas são lavadas 3 vezes com PBSA. As lamínulas são incubadas em soro normalizador 5µl/ml em solução de Triton X-100 0,3% em PBSA por 1h e lavadas novamente. Adiciona-se a seguir o anticorpo primário diluído em Triton X-100 0,3% em PBSA, 1mg/ml BSA e incuba-se "overnight" em câmara úmida. Após lavagem, incuba-se as lamínulas com anticorpo secundário diluído 1:200 em solução de Triton X-100 0,3% em PBSA, 15µl/ml de soro bovino, por 1h e faz-se nova lavagem. As células são incubadas com o complexo avidina/biotina por 1h e novamente lavadas com PBSA. A reação enzimática é feita utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como substrato, corando os núcleos marcados de marron. As lamínulas são montadas em lâminas de vidro e contracoradas com hematoxilina/carbonato de lítio. Os núcleos não marcados são corados de azul. As células foram contadas (500 células/lamínula) em microscópio

Nikon. Os valores obtidos foram submetidos ao teste Qui quadrado e foram considerados significativos os valores que apresentaram $p < 0,05$.

IV.7 - Transformação de Bactérias por Choque Térmico:

Incuba-se 200 μ l de uma suspensão de bactérias competentes com 100 ng do plasmídeo de interesse em gelo por 30 min. Transfere-se a suspensão para banho a 42°C por 1 min. e novamente para gelo por 10 min. Adiciona-se 1,5ml de LB e incuba-se a 37°C por 1h. Plaqueia-se as bactérias em LB sólido contendo o antibiótico adequado e as colônias transformadas são selecionadas.

IV.8 - Preparação de DNA de Plasmídeos:

Após transformação das bactérias com os plasmídeos de interesse, faz-se uma mini-prep utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), e os plasmídeos são analisados por digestão enzimática. Após verificar a qualidade dos plasmídeos, faz-se uma maxi-prep. Inocula-se meio de cultura LB com uma colônia isolada da bactéria que contém o plasmídeo de interesse e incuba-se "overnight" a 37°C sob agitação. Os plasmídeos são isolados por lise alcalina seguida de gradiente de CsCl, conforme descrito em Sambrook et al, 1989.

IV.9 - Extração de Fragmentos de Plasmídeos:

Os plasmídeos são digeridos com enzimas de restrição e a seguir resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse são cortados do gel e colocados em membranas de diálise com TBE. Após eletroeluição dos fragmentos faz-se uma extração com fenol/clorofórmio para eliminar o brometo de etídeo. A seguir faz-se uma extração com clorofórmio, para eliminar o fenol e precipita-se o DNA dos plasmídeos com acetato de sódio 3M pH 4,8 (1/10 V/V) e etanol absoluto 100% (3/1 V/V) a -20°C . Centrifuga-se a 14.000 rpm por 15 min., e lava-se o precipitado com etanol 70% gelado. Deixa-se a temperatura ambiente para secar o precipitado e os plasmídeos são ressuspensos em água milliQ.

IV.10 - Sistema de Expressão Tet-On (Clontech):

O transativador reverso controlado por tetraciclina (rtTA) é uma fusão do repressor reverso Tet selvagem (rTetR) com o domínio de ativação VP16 (AD) do vírus Herpes simplex. O elemento responsivo a Tet (TRE) localiza-se a 5' do promotor mínimo de citomegalovírus ($P_{\min}\text{CMV}$). O repressor reverso rTetR foi criado por 4 trocas de aminoácidos, que revertem a resposta da proteína a Doxíciclina (Dox) ou Tetraciclina. O rtTA liga-se ao TRE e ativa a transcrição do gene de interesse na presença de Doxíciclina. Sabe-se que o rTetR é 100 vezes menos sensível a Tetraciclina. O mecanismo de ativação da transcrição no sistema Tet-On está mostrado no esquema abaixo:

O sistema de expressão Tet-On requer duas transfecções estáveis consecutivas para originar uma linhagem celular que contenha os genes que codificam para a proteína regulatória e o gene de interesse sob o controle do TRE. Na primeira transfecção o plasmídeo pTet-On é transfectado, e o plasmídeo pTRE contendo o gene de interesse clonado é introduzido na segunda transfecção, assim como o plasmídeo contendo o gene de resistência a higromicina, pTKHyg.

IV.11 - Transfecção de Células:

Utiliza-se o reagente Lipofectina (**Gibco**) e a transfecção é feita em DME sem soro e sem antibiótico por 24h. A seguir as células são mantidas por 48h em DME 10% de soro, repicadas para três placas P100, e mantidas em meio de seleção (DME 10% de soro /400µg/ml G418 para pSVK3D1 e 400µg/ml G418/200µg/ml Higromicina para Tet3MTRED1H3). Após cerca de três semanas, as colônias obtidas são isoladas em meio de manutenção (DME 10% de soro/100µg/ml G418 para pSVK3D1 e 100µg/ml G418/50µg/ml Higromicina para Tet3MTRED1H3) e congeladas.

O protocolo de transfecção transiente consiste em transfecção com o reagente Gene Porter 2 (**Gene Therapy Systems**) após 24h do plaqueamento em meio sem soro e sem antibióticos. As células são incubadas por 6h e então adiciona-se o mesmo volume de DME 20% FCS, resultando em uma concentração final de 10% FCS, e incuba-se durante a noite. Na manhã seguinte as células são carenciadas por 48h e faz-se o experimento.

IV.12 - Obtenção de clones que superexpressam ciclina D1:

Os transfectantes de Y-1 contendo o plasmídeo Tet-On foram submetidos a ensaio de atividade de luciferase (Luciferase Reporter Assay, **Promega**), para verificar os níveis de indução com doxíciclina (Ana Paula Lepique-resultados não publicados). Os clones que apresentaram melhor indução foram transfectados com a construção TRE-cycD1. O cDNA de ciclina D1, de 1,3 kb, foi subclonado no plasmídeo TRE nos sítios de EcoRI e a orientação do cDNA foi verificada através de ensaio com enzimas de restrição. Após transfecção do plasmídeo TRE-cycD1 juntamente com o plasmídeo de resistência a higromicina, a dupla seleção foi feita em meio contendo 400µg/ml G418 e 200µg/ml Higromicina, originando colônias que foram isoladas e mantidas em meio de manutenção (DME 10%FCS/100µg/ml G418/50µg/ml Higromicina). Os clones foram testados por Western blot, e verificou-se que os clones obtidos apresentavam expressão constitutiva de ciclina D1.

O cDNA de ciclina D1 também foi subclonado nos sítios de EcoRI no vetor pSVK3, que é um vetor de expressão constitutiva tendo o gene de

interesse sob o controle de um promotor forte, SV40. A construção foi transfectada permanentemente ou transientemente conforme descrito a seguir.

IV.13 - Sistema Myc-ER:

Esta construção contém o gene quimérico c-myc humano/receptor de estrógeno sob controle de um promotor forte. O sistema consiste em expressão constitutiva da quimera c-Myc/ER e acúmulo desta proteína no citoplasma. Esta quimera é ativada por 4'OH-tamoxifen, sendo liberada do complexo inibitório de hsp90 e transportada para o núcleo. 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.

IV.14 - Extração de RNA total e Northern blot:

As células mantidas em placas são lavadas duas vezes com PBS e o RNA total é extraído com o reagente **TRIZOL (Gibco)**. Após quantificação, 20 µg de amostra de RNA são diluídas em tampão de amostra para RNA e desnaturadas a 65°C. As amostras são resolvidas por eletroforese em gel de agarose 1% desnaturante (3,7% formaldeído e 1X MOPS) a 5V por cm de gel. O gel é lavado com água destilada 3 vezes por 20 minutos e com SSC 15X 1 vez por 20 minutos, e transferido para membrana de nitrocelulose (Hybond-N, **Amersham Pharmacia**) por capilaridade “overnight” em 15X SSC. A membrana é aquecida a 80°C por 2h e hibridizada com a sondade interesse. Faz-se em paralelo uma hibridização com uma sonda de GAPDH de camundongo, para normalização.

IV.15 - Marcação de Sonda Radioativa:

O cDNA de ciclina D1 (1,3 kb) foi utilizado como sonda nos experimentos de Northern blot. A sequência foi marcada com ^{32}P α -dCTP por reação de “Random primer extension”, utilizando-se enzima Klenow. 25 ng de cDNA foram fervidos juntamente com 100µM de oligo randômico (pdN6, **Amersham Pharmacia**) por 10 min. para desnaturação das fitas e, a seguir, resfriados em gelo. Adicionou-se 100µM de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP), 1X “filling in” buffer, 1U de “Klenow fragment” e 50µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP. Incubou-se a reação por 3h a 37°C e a seguir a sonda foi purificada em coluna G50 Sephadex, para separação dos nucleotídeos livres.

IV.16 - Hibridização:

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de pré-hibridização por 3h a 42°C e a seguir incubadas com a sonda marcada a 42°C “overnight” em solução de hibridização. A membrana é lavada 2 vezes com solução 1% SSC/0,1%SDS e uma vez com solução 0,1%SSC/0,1%SDS à temperatura ambiente. A última lavagem é feita com solução 0,1%SSC/0,1%SDS a 42°C. A membrana é embrulhada em filme plástico e exposta ao filme de raio X por 24h.

IV.17 - Ensaio de Entrada em S por Incorporação de BrdU:

Células carenciadas para soro por 48h são plaqueadas em lamínulas redondas (1×10^5), e adiciona-se 100 μ M BrdU após 12h de tratamento. A incorporação é feita de 12 a 24 h. As células são lavadas com PBS e fixadas em metanol por 10 min. As lamínulas são incubadas em HCl 1,5N por 30 min. sob agitação, lavadas 3X 10 min. com PBS e invertidas sobre 40 μ l de anticorpo anti-BrdU (**Amersham/Pharmacia**) por 30 min. Após lavagem das lamínulas 3X por 5min. cada com PBS, incuba-se as lamínulas com anticorpo secundário conjugado com FITC (fluorescein isothiocyanate - **Sigma**) por 30 min. Faz-se 3 lavagens por 5 min.cada com PBS e a seguir as lamínulas são incubadas com 5 μ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole- **Sigma**) por 20min para corar os núcleos totais. Lava-se 3X por 5 min. cada com PBS e as lamínulas são coladas com Entelan sobre uma lâmina de vidro, com as células voltadas para cima. A seguir adiciona-se uma gota de óleo mineral sobre as células e cobre-se com uma lamínula quadrada. As células são analisadas em

microscópio Nikon Fluorophot utilizando-se dois filtros: UV 330-380 para visualizar os núcleos corados com DAPI e IF420-490 para visualizar os núcleos marcados com BrdU. Cerca de 500-600 núcleos são contados por lamínula. Os valores obtidos foram submetidos ao teste Qui quadrado e foram considerados significativos os valores que apresentaram $p < 0,05$.

Para ensaios com transfecção transiente, os experimentos de transfecção e entrada em S foram feitos segundo o protocolo abaixo:

IV.18 - Southern blot:

O DNA genômico é extraído com o reagente DNAzol (Gibco) e ressuspensão em água. O DNA é então digerido com enzimas de restrição “overnight” e separado por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel é lavado 1X com solução desnaturante I por 15 min., 2X com solução desnaturante II por 30 min., 2X com solução neutralizante por 30 min. e 1X com SSC 15X por 30 min. Transfere-se o DNA para membrana de nitrocelulose por capilaridade “overnight” em SSC 15X. A membrana é aquecida por 2h a 80°C. A hibridização é feita conforme descrito para Northern blot.

IV.19 - Sequenciamento:

O sequenciamento foi feito utilizando-se o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (**Amersham Pharmacia**), que se baseia no método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Os ddNTPs são marcados com dois tipos de corantes: fluoresceína e quatro tipos diferentes de rodaminas, um para cada ddNTP. A fluoresceína absorve energia incidente do laser do equipamento de detecção e transfere para a rodamina, que por sua vez emite luz em seu comprimento de onda característico. Esta transferência de energia aumenta a sensibilidade do método.

IV.20 - HPLC:

Dissolveu-se a corticotropina A em água destilada e retirou-se uma alíquota desta solução, que posteriormente foi liofilizada e tomada como extrato bruto (Br). A solução foi fracionada por HPLC em coluna C18 preparativa por gradiente de acetonitrila e água (solvente A: água; solvente B: acetonitrila, água e ácido trifluoroacético). A separação da mistura foi feita utilizando-se um gradiente de solvente, partindo-se de 100% de A e chegando-se a 100% de B. As frações foram coletadas manualmente detectando a absorbância em 220nm. As frações foram então liofilizadas, ressuspensas em 1mL de água e testadas em células. O fracionamento da corticotropina A foi feito no laboratório do Prof. Luiz Juliano, da Escola Paulista de Medicina.

V - RESULTADOS

V.1 - Obtenção de clones que superexpressam ciclina D1

Para obter clones induzíveis que superexpressam ciclina D1, utilizou-se o “Tet-On Gene Expression System” da **Clontech**. O cDNA de ciclina D1 foi subclonado no sítio de EcoRI do sítio de clonagem do plasmídeo pTRE. As bactérias foram transformadas com a construção pTRED1 (**fig.5**) e os clones isolados foram analisados por digestão enzimática (**fig.6 e fig.7**) e usados na transfecção de células Y-1 que já contém o plasmídeo pTet-On integrado. Os transfectantes de Y-1 contendo o plasmídeo pTet-On foram testados para a resposta do sistema Tet-On através de transfecção transitória, tendo como gene repórter o gene da luciferase. O ensaio envolveu medir a atividade da luciferase (trabalho desenvolvido por Ana Paula Lepique em nosso laboratório).

Figura 5: Esquema da construção pTRED1. O cDNA de ciclina D1 (1,3 kbp) foi subclonado no sítio de EcoRI. Os sítios de HincII e de EcoRI do cDNA ou do vetor estão representados no esquema. Para saber a orientação do cDNA de ciclina D1, foi feita uma digestão com HincII. A orientação 5'→3' resulta em três fragmentos, de 230 bp, 485 bp e 3235 bp. Na fotografia do gel (fig. 7) não é possível ver o fragmento de 230 bp.

Figura 6: Digestão de pTRED1 com EcoRI. Plasmídeos das colônias isoladas foram digeridos com EcoRI para verificar se o tamanho do inserto correspondia ao cDNA de ciclina D1. Pode-se verificar que todos os clones analisados possuem um inserto de 1,3 kbp, que corresponde ao tamanho do cDNA de ciclina D1.

D – digerido

ND – não digerido

Figura 7: Análise da orientação do cDNA de ciclina D1 nas construções pTRED1 por ensaio de digestão com HincII. Plasmídeos das colônias isoladas foram submetidos a digestão com HincII, para verificar se a orientação do cDNA de ciclina D1 estava correta. Todos apresentaram um fragmento de 485 bp após digestão, indicando que a orientação do inserto está correta, conforme pode ser visto no mapa esquemático do plasmídeo pTRED1.

Um outro plasmídeo, pSVK3 (Amersham/Pharmacia) foi utilizado para clonagem do cDNA de ciclina D1. O cDNA de ciclina D1 foi subclonado no sítio de EcoRI do sítio de clonagem, ficando sob controle do promotor forte de SV40. Após transformação de bactérias com a construção pSVK3D1 (fig.8), isolou-se as colônias e fez-se análise por digestão enzimática (fig.9 e fig.10).

Figura 8: Esquema da construção pSVK3D1. O cDNA de ciclina D1 (1,3 kbp) foi subclonado no sítio de EcoRI. Os sítios de AccI e de EcoRI do cDNA ou do vetor estão representados no esquema. Para saber a orientação do cDNA de ciclina D1 foi feita uma digestão com AccI. A orientação 5'→ 3' resulta em três fragmentos, de 33 bp, 350 bp e 4869 bp. Na fotografia do gel (fig. 10) não é possível visualizar o fragmento de 33 bp.

ND - não digerido

D - digerido

Figura 9: Digestão de pSVK3D1 com EcoRI. Plasmídeos das colônias isoladas foram digeridos com EcoRI para verificar se o tamanho do inserto correspondia ao cDNA de ciclina D1. Pode-se verificar que todos os clones analisados possuem um inserto de 1,3 kbp, que corresponde ao tamanho do cDNA de ciclina D1.

ND - não digerido

D - digerido

Figura 10: Análise da orientação do cDNA de ciclina D1 nas construções pSVK3D1 por ensaio de digestão com AccI. Plasmídeos das colônias isoladas foram submetidos a digestão com AccI, para verificar se a orientação do cDNA de ciclina D1 estava correta. Apenas um apresentou um fragmento de 350 bp após digestão, indicando que a orientação do inserto está correta, conforme pode ser visto no mapa esquemático do plasmídeo pSVK3D1.

As construções foram sequenciadas, usando-se o kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia), e os primers sense, para pSVK3D1, e antisense, para TRED1 (fig.11).

Figura 11b: Cromatograma do sequenciamento 3: construção pTRED1, utilizando oligo antisense.

As sequências foram comparadas entre si e com a sequência consenso de cycD1, utilizando o programa Clustal W, e apresentaram 100% de identidade.

Complementary Sequence2	CGCCTGCAGCTGCTGGGG-CCACCTGCATGTTCTGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCAT	190
ConsensusCyclinD1	CGCCTGCAGCTGCTGGGGGCCACCTGCATGTTCTGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCAT	538
Sequence3	-----GCATGTTCTGTGGCCTCTAAGATGAAGGAGACCAT	35
ComplementarySequence2	CCCTTGACTGCCGAGAAATTGTGCATCTACACTGACAACTCTATCCGGCCCGAGGAGCTG	250
ConsensusCyclinD1	CCCTTGACTGCCGAGAAATTGTGCATCTACACTGACAACTCTATCCGGCCCGAGGAGCTG	598
Sequence3	CCCTTGACTGCCGAGAAATTGTGCATCTACACTGACAACTCTATCCGGCCCGAGGAGCTG	95
ComplementarySequence2	CTGCAAAATGGAACTGCTTCTGTGTAACAAAGCTCAAGTGGAACTGGCCGCCATGACTCCC	310
ConsensusCyclinD1	CTGCAAAATGGAACTGCTTCTGTGTAACAAAGCTCAAGTGGAACTGGCCGCCATGACTCCC	658
Sequence3	CTGCAAAATGGAACTGCTTCTGTGTAACAAAGCTCAAGTGGAACTGGCCGCCATGACTCCC	155
ComplementarySequence2	CACGATTTTCATCGAACACTTCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAAGCAGACC	370
ConsensusCyclinD1	CACGATTTTCATCGAACACTTCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAAGCAGACC	718
Sequence3	CACGATTTTCATCGAACACTTCTCTCCAAAATGCCAGAGGCGGATGAGAACAAAGCAGACC	215
ComplementarySequence2	ATCCGCAAGCATGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTTTCATTTCC	430
ConsensusCyclinD1	ATCCGCAAGCATGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTTTCATTTCC	778
Sequence3	ATCCGCAAGCATGCACAGACCTTTGTGGCCCTCTGTGCCACAGATGTGAAGTTTCATTTCC	275
ComplementarySequence2	AACTCCACCTTCATGCTAGCTGCTGGNAGCGTGGTGGCTGCGATGCAAGGCTGAACTG	490
ConsensusCyclinD1	AACTCCACCTTCATGCTAGCTGCTGGNAGCGTGGTGGCTGCGATGCAAGGCTGAACTG	838
Sequence3	AACTCCACCTTCATGCTAGCTGCTGGNAGCGTGGTGGCTGCGATGCAAGGCTGAACTG	335
ComplementarySequence2	G-CAGCCCCAACNACTTCCTC-----	510
ConsensusCyclinD1	GGCAGCCCCAACAACTTCCTCTCTCTGCTACCGCACAAAGCACTTTCTTTCCAGAGTCATC	898
Sequence3	GGCAGCCCCAACAACTTCCTCTCTCTGCTACCGCACAAAGCACTTTCTTTCCAGAGTCAT	395

Sequence 2: pSVK3D1

Sequence 3: pTRED1

Consensus Cyclin D1: sequência consenso de ciclina D1 (Matsushime et al, 1991)

Figura 11c: Comparação entre as sequências obtidas e a sequência consenso de cycD1. Identidade de 100% entre si e com a sequência consenso.

Por transfecção permanente das construções pSVK3D1 e TRED1, obteve-se respectivamente 20 e 8 clones. Os clones foram inicialmente analisados por Western blot e somente os clones que apresentaram melhor indução foram analisados por Southern blot (**fig.12b**). Pode-se observar que ocorre um aumento da expressão de ciclina D1 em presença de doxiciclina no clone Tet3MD1H/3. Apesar dessa indução, o basal de expressão da proteína é muito alto, diferentemente da indução de ciclina D1 por FGF-2 em células Y-1(**fig.12a**), onde o padrão é tudo ou nada. Logo, os clones Tet3MD1H/3 obtidos não eram suficientemente bons para mimetizar a indução do gene endógeno. Estes clones apresentam expressão semelhante aos clones constitutivos pSVK3D1. Os clones D1G e Tet3MD1H/3 foram utilizados em experimentos dos **itens V.3 e V.6**.

Figura 12a: Western blot de clones que superexpressam ciclina D1. A expressão de ciclina D1 é constitutiva nos dois clones.

D1G- células Y-1 transfectadas com a construção pSVK3D1

Tet3MD1H/3- células Y-1 transfectadas com a construção TRED1

Dox- doxiciclina

- 1 - Y-1
 2 - D1G
 3 - Tet3MD1H/3
 4, 5, 6 e 7 - cDNA de ciclina D1 0,001, 0,01, 0,1 e 1 ng

Figura 12b: Southern blot de clones que superexpressam ciclina D1, mostrando que houve integração do cDNA exógeno no DNA genômico. Os DNAs genômicos foram digeridos com EcoRI por 10h e separado em gel de agarose 1%. Utilizou-se como sonda um fragmento do cDNA de ciclina D1 de camundongo de cerca de 400bp, obtido através de digestão do cDNA de camundongo com AvaI. Após exposição de 24h pode-se observar a banda de ciclina D1 endógena (A, faixa 1). As bandas presentes nos clones D1G e Tet3MD1H/3, correspondentes ao cDNA exógeno, são melhor visualizadas após exposição de 10h (B, faixas 2 e 3).

V.2 - Sinalização por FGF-2 e ACTH

Células Y-1 carenciadas para soro por 48h foram tratadas com FGF2 20ng/ml e a expressão de ciclina D1 foi analisada por Western blot. A indução é relativamente tardia, atingindo o máximo em torno de 5h (**fig.13**). Verificou-se que tratamentos sustentados ou pulsos de 15 min a 2h de FGF2 resultam em uma forte indução de ciclina D1 (**fig.14**).

Figura 13: Western blot. Cinética de expressão da proteína ciclina D1 em tratamento sustentado de FGF2 em células Y-1 carenciadas por 48h. A cinética é idêntica para pulsos.

C = controle não tratado

Figura 14: Western blot. Pulsos de 15 min a 2h de FGF2 (20ng/ml) induzem fortemente a proteína ciclina D1 em células Y-1 carenciadas por 48h. A expressão é medida após 6h, independentemente do tamanho do pulso.

Para verificar se a indução de ciclina D1 é dependente de síntese de proteína, células Y-1 carenciadas para soro por 48h foram tratadas com FGF2 20ng/ml ou 1 ng/ml em presença ou ausência de cicloheximida (10µg/ml), um conhecido inibidor de síntese proteica. A **figura 15** (experimento de Northern blot) mostra que não há indução do mRNA de ciclina D1 por FGF2 em presença de cicloheximida, mostrando que a indução deste gene depende de síntese de proteína. Este resultado está de acordo com dados da literatura, que mostram que a indução do mRNA de ciclina D1 é regulada por fatores de crescimento e soro e mediada por AP-1, c-Myc e outros fatores de transcrição, sintetizados "de novo".

C = controle não tratado

1 = FGF2 20ng/ml

2 = FGF2 1ng/ml

Figura 15: Northern blot. O mRNA de ciclina D1 não é induzido por FGF2 quando as células são tratadas com cycloheximida (10µg/ml), indicando que a a indução de ciclina D1 depende de síntese de proteína. Cicloheximida foi adicionada 30 min antes da adição de FGF-2 e mantida durante todo o experimento. As células foram lisadas 5h após adição de FGF-2.

Verificamos anteriormente (Telma Tiemi Schwindt, dissertação de mestrado, 1998) que corticotropina A (**Sigma**) bloqueia a indução de ciclina D1 por FGF-2 em células sincronizadas em G0. Este efeito de corticotropina A pode ser um mecanismo de ação anti-mitogênica em células Y-1. Nossos resultados preliminares indicaram que este efeito de corticotropina A não era devido a ACTH₁₋₃₉. Estas observações iniciais foram confirmadas e totalmente exploradas nesta tese.

C – controle não tratado

A – FGF 0-2h

B – FGF 0-2h e corticotropina A 4-6h

C – FGF 0-2h e ACTH sintético Sigma 1-39 4-6h

D – FGF 0-2h e ACTH sintético EPM 1-24 4-6h

E – FGF 0-2h e ACTH sintético EPM 1-39 4-6h

F – FGF + ACTH sintético Sigma 1-39 0-2h

G – FGF + ACTH sintético EPM 1-24 0-2h

H – FGF + ACTH sintético EPM 1-39 0-2h

I – FGF + corticotropina A 0-2h

Figura 16: Western blot. Efeito de corticotropina A e formas sintéticas de ACTH sobre o estímulo da expressão de ciclinas D por FGF2 em células Y-1. Células Y-1 carenciadas por 48h foram tratadas com FGF2 (20ng/ml), corticotropina A (10^{-8} M) peptídeos sintéticos (10^{-8} M). Quando adicionados no final de G1 (4-6h), tanto corticotropina A quanto os peptídeos sintéticos não apresentam efeito de bloqueio sobre FGF2 em células Y-1 carenciadas. Quando adicionada simultaneamente com FGF2 no início de G1 (0-2h), corticotropina A bloqueia o efeito de FGF2 em relação à expressão de ciclinas D, mas os peptídeos sintéticos não têm efeito.

Corticotropina A (Sigma) inibe a indução da proteína ciclina D1 por FGF2, enquanto o peptídeo sintético ACTH₁₋₃₉ (sintetizado na EPM ou obtido comercialmente da Sigma) não apresenta nenhum efeito inibitório

ciclina D1 é fraca ou nenhuma quando utilizam-se os inibidores de ERK-MAPK e PI3K.

18A

C = controle não tratado

1 = FGF 0,01 ng/ml

2 = FGF 0,1 ng/ml

3 = FGF 0,5 ng/ml

4 = FGF 5 ng/ml

inibidor MEK = 50 μ M

18B

C = controle não tratado

1 = FGF 5 ng/ml

2 = FCS 10%

inibidor PI3K = 300 nM

Figura 18: Western blots mostram que não há indução da proteína ciclina D1 por FGF2 na presença de inibidores específicos de ERK-MAPK (a) e PI3K (b) (PD98059 e Wortmannin respectivamente), sugerindo que a indução de ciclina D1 depende de ambas as vias. Os inibidores foram adicionados 30 min. antes do pulso de FGF2 e mantidos durante todo o tempo. A última faixa, correspondente ao tratamento com DMSO é um controle interno do experimento, uma vez que os inibidores são dissolvidos em DMSO.

V.3 - Importância de ciclina D1 e c-Myc no controle do ciclo celular por ACTH

O antagonismo entre FGF-2 e ACTH na estimulação da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ tem sido amplamente estudado em nosso laboratório (Armelin et al, 1996; Lotfi et al, 1997; Lotfi et al, 2000). Recentemente sugerimos que o controle da estabilidade da proteína c-Myc é o principal ponto de convergência desse antagonismo: FGF-2 promove a estabilidade, enquanto ACTH promove a degradação de c-Myc (A.P. Lepique, tese de doutoramento, 2000; Lepique et al, 2000). Para testar esta hipótese, mostramos que a expressão ectópica da proteína de fusão MycER torna células Y-1 resistentes ao efeito inibitório de ACTH sobre a indução da entrada em S promovida por FGF-2 (A.P. Lepique, tese de doutoramento, 2000; Lepique, Hajj, Schwindt & Armelin, em preparação).

Nesta tese estamos relatando que ACTH não tem nenhum efeito sobre a indução de ciclina D1 por FGF-2 em células Y-1 bloqueadas em G0 por carenciamento de soro. Esta observação implica que c-Myc não é necessária para a expressão do gene de ciclina D1 em células Y-1, sugerindo que c-Myc e ciclina D1 são expressos independentemente e provavelmente têm atividades complementares na transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$. Restava saber se a expressão concomitante de c-Myc e ciclina D1 era suficiente para mimetizar a atividade mitogênica de FGF-2. Considerávamos de antemão que esta possibilidade era improvável, uma vez que sabemos que a indução dos genes *c-fos* e *c-jun* é necessária para a atividade mitogênica de FGF-2 em células Y-1 (Lotfi & Armelin, 2001). Para responder a esta questão recorremos a transfecções transientes de MycER e ciclina D1. Os resultados confirmam

claramente nossa hipótese, isto é, indução de MycER e expressão constitutiva de ciclina D1 não é suficiente para induzir significativamente a entrada em S de células Y-1 (**fig.19A**). Por outro lado, indução de MycER e expressão constitutiva de ciclina D1 em presença de ACTH causam um significativo estímulo da síntese de DNA (**fig.19A**). Estes resultados foram corroborados em experimentos de transfecção transiente de MycER em transfectantes estáveis de Y-1 que superexpressam ciclina D1: indução de MycER tem efeito pequeno, mas indução de MycER em presença de ACTH leva a um estímulo elevado da síntese de DNA (**fig. 19B**).

Estes resultados permitem-nos tirar as seguintes conclusões: a) a expressão de ciclina D1 é necessária para a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em células Y-1; b) ACTH tem efeito mitogênico em células Y-1 que expressam c-Myc e ciclina D1; c) as proteínas c-Myc, c-Fos, c-Jun e ciclina D1 são necessárias e têm atividades complementares na transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ de células Y-1.

19A

19B

Figura 19: Ensaio de entrada em S por incorporação de BrdU. Superexpressão de c-Myc e/ou ciclina D1 não é suficiente para induzir a entrada em S de células Y-1. A expressão simultânea de c-Myc e ciclina D1 em presença de ACTH induz a entrada em S. A- Transfecção transiente dupla de MycER e ciclina D1. B- Transfecção transiente de MycER em um clone que superexpressa ciclina D1. As abcissas representam os tipos de tratamento.

V.4 - Bloqueio do ciclo celular por ACTH₁₋₃₉:

Células Y-1 carenciadas para soro por 48h apresentam nível basal alto da proteína Akt na forma fosforilada. Mostramos recentemente que, em células Y-1, a adição de ACTH₁₋₃₉ causa rápida desfosforilação de Akt, provavelmente por ativação de uma fosfatase específica (Forti & Armelin, 2000). Sabe-se que Akt é uma enzima crítica no controle do ciclo celular, promovendo proliferação e inibindo apoptose (Chan et al, 1999). Observações de outros laboratórios sugerem que esta atividade mitótica e anti-apoptótica de Akt se deve ao bloqueio da expressão de p27^{Kip1}, um dos inibidores do complexo ciclina-CDK (Scheid & Woodgett, 2001). Em face disso, e de posse de informação de que ACTH desativa Akt em células Y-1, fomos verificar se esse hormônio induz a expressão de p27^{Kip1}.

Ensaio de Western blot (**fig.20**) mostram que células Y-1 bloqueadas em G0 por carenciamento de soro exibem níveis basais moderados de p27^{Kip1}, que são drasticamente reduzidos pela adição de FGF-2 e soro. Conforme nossa hipótese, ACTH (2 ou 5h) causa forte indução de p27^{Kip1} em células Y-1 carenciadas ou mesmo em células Y-1 tratadas com FGF-2 ou soro (**fig.20**). Este efeito não surpreende, uma vez que a ativação de Akt em células Y-1 depende da atividade de PI3K, cuja inibição por Wortmanina causa rápida desfosforilação de Akt (Forti & Armelin, 2000).

Células Y-1 carenciadas para soro por 48h foram tratadas com ACTH₁₋₃₉, FGF-2, FCS, combinação de FGF-2/ACTH, ou FCS/ACTH. No tratamento de ACTH 2h (A2h) as células foram lavadas após o tratamento e mantidas em DME sem soro até 5h, tempo em que fez-se a lise de todas as placas. No caso do tratamento de ACTH 5h em presença de Wortmanina

(W/A5h), o inibidor Wortmanina foi adicionado 30 minutos antes da adição de ACTH. A expressão de p27 foi detectada por Western blot, como mostrado na **figura 20**.

C= controle não tratado

FCS= soro fetal bovino 20%

FGF= FGF2 20 ng/ml

A= ACTH 1-39 sintético

W= Wortmannin

Figura 20: Western blot. Efeitos de ACTH₁₋₃₉ na expressão de p27 em células Y-1 carenciadas para soro.

Em conclusão, ACTH dispara um mecanismo de bloqueio da transição G0→G1→S ao promover concomitantemente a desfosforilação de Akt e a indução de p27^{Kip1}. Mas este efeito inibitório de ACTH é ineficaz se c-Myc e ciclina D1 forem expressos em células Y-1, conforme demonstrado pelos experimentos de transfecção mostrados na **figura 19**.

V.5 - Fracionamento da Corticotropina A

Os resultados apresentados no item V.2 mostram que ACTH₁₋₃₉ não é o peptídeo responsável pelo efeito inibitório da indução de ciclina D1 por FGF2 quando utilizamos Corticotropina A. Tornou-se então essencial fracionar a preparação de Corticotropina A e analisar os componentes, com o objetivo de determinar qual ou quais componentes poderiam estar causando este tipo de efeito. Para tanto, 10 mg de corticotropina A foram dissolvidos em 3 ml de água destilada. Desta solução retirou-se uma alíquota que foi liofilizada e mantida como amostra do extrato bruto (Br). A solução restante foi fracionada por HPLC em coluna C18 preparativa através de gradiente de acetonitrila e água. O solvente A é totalmente aquoso, e o solvente B é composto por acetonitrila, água e ácido trifluoroacético ACN/H₂O/TFA. A separação da mistura foi feita utilizando-se um gradiente linear de solvente, partindo-se de 100% de A e chegando-se a 100% de B. As frações foram coletadas manualmente quando havia oscilação significativa na absorbância (220nm). Dessa forma pôde-se recuperar os picos majoritários e recuperar uma quantidade de material suficiente para ser testada quanto à efeitos biológicos em células de mamíferos. As frações foram então liofilizadas e cada uma delas foi ressuspensa em 1mL de água e quantificada em espectrofotômetro a 220nm. A **figura 21** mostra o perfil cromatográfico da preparação de corticotropina A após fracionamento por HPLC.

Figura 21: Cromatograma do primeiro fracionamento da Corticotropina A. Gradiente linear de solvente. O eixo das abcissas corresponde ao tempo de retenção em minutos. Os números correspondem às frações que apresentaram atividade.

As frações foram testadas quanto à ativação de ERK 1,2 (**fig. 22**) e à inibição da indução de ciclina D1 por FGF-2 (**fig. 23**). Ambos os experimentos foram feitos em células Y-1 carenciadas para soro por 48h.

C = controle não tratado

FGF = 20ng/ml

A = Corticotropina A - 5µg/ml

B1, B2, B5 = extrato bruto nas concentrações 1, 2 e 5 µg/ml

F5-F24 = frações 5 a 24 – 5 µg/ml

Figura 22: Western blot. Ativação de ERK 1,2 em células Y-1 por frações resultantes da separação da corticotropina A por HPLC.

Deve-se notar na **figura 22** (B1, B2 e B5) que a ativação de ERK 1,2 pelo extrato bruto é inversamente proporcional à concentração. Isso provavelmente é devido à presença de algum peptídeo que tem efeito inibitório sobre o peptídeo ativador de ERK 1,2. Assim sendo, em altas concentrações o efeito do inibidor estaria predominando sobre o efeito do ativador. Em concentrações mais baixas esse efeito desaparece.

C = controle não tratado

FGF = 20ng/ml

Cort. A = Corticotropina A – 5 µg/ml

B1, B2, B5 = extrato bruto nas concentrações 1, 2 e 5 µg/ml

F5-F24 = frações 5 a 24 – 5 µg/ml

Figura 23: Western blot. Efeito inibitório das frações sobre a indução de ciclina D1 por FGF2 em células Y-1.

Tivemos também que nos certificar que o efeito inibitório das frações sobre a indução de ciclina D1 por FGF2 era uma resposta característica de células adrenais. Fez-se então experimentos similares àqueles feitos em células Y-1, utilizando-se a linhagem de fibroblastos de camundongo A-31. As **figuras 24A e 24B** mostram que, na linhagem A-31, as frações ativas em Y-1 (5, 6, 13 e 14) não ativam ERK 1,2, assim como não bloqueiam a indução de ciclina D1 por FGF2. Isto mostra que as respostas observadas em presença das frações são características de células adrenais.

24A

C = controle não tratado

FGF = 20ng/ml

Br = extrato bruto na concentração de 2 μ g

F5-F14 = frações 5 a 14 - 5 μ g/ml

24B

C = controle não tratado

FGF = 20ng/ml

B1 = extrato bruto na concentração de 1 μ g

F5-F14 = frações 5 a 14 10⁻⁶ M

Figura 24: Western blot. Efeito das frações na ativação de ERK 1,2 (a) e sobre a indução de ciclina D1 por FGF2 (b) em células de fibroblastos de camundongo A-31.

Podemos observar que além de FGF2, Corticotropina A e o extrato bruto, apenas as frações 5, 6, 13 e 14 apresentaram efeito de ativação de

ERK 1,2 em células Y-1. Interessantemente, as mesmas frações tiveram efeito inibitório sobre FGF2 na indução de ciclina D1. Nota-se também que a fração 24, correspondente ao hormônio ACTH1-39 (identificado por espectro de massa e confirmado por microsequenciamento N-terminal) não apresentou nenhum efeito.

Fomos analisar as frações ativas com mais cuidado através de espectrometria de massa, utilizando-se um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight), equipamento que pertence ao laboratório do Prof. Luiz Juliano, da Escola Paulista de Medicina. Ambas as etapas, de fracionamento e de análise de massa, foram feitas sob orientação da Profa. Maria Aparecida Juliano, também da Escola Paulista de Medicina. As **figuras 25A, 25B, 25C e 25D** mostram os picos resultantes de análise por espectrometria de massa.

A- Fração 5/6

B- Fração 13 **C- Fração 14**

D- Fração 24

Figura 25: Consideraremos as frações 5 e 6 como uma única fração, uma vez que ambas tem a mesma composição, conforme visto em análise posterior. Os espectros de massa mostram que a fração 5/6 apresenta três componentes majoritários de massas 1180, 1790 e 2478 e alguns contaminantes em menor quantidade (a). As frações 13 e 14 apresentam um único pico majoritário de massa 2176, todavia a fração 13 apresenta maior quantidade de contaminantes que a fração 14 (b, c). A fração 24 tem massa de 4550 e corresponde ao ACTH₁₋₃₉.

As massas das frações 5/6, 13 e 14 foram comparadas com um banco de dados de peptídeos e submetidas a microsequenciamento. Determinou-se então a composição das frações 13 e 14, cujo principal componente corresponde ao β -MSH (massa 2176), peptídeo de 18 aminoácidos produto da clivagem de POMC (Pró-opiomelancortina). No entanto o sequenciamento N-terminal da fração 5/6 não pôde ser feito, pois o(s) peptídeo(s) presente(s)

na fração estava(m) protegido(s) e havia pouco material para realizar a química de desproteção. Além disso, a presença de dois picos indicava uma provável contaminação da fração ativa com a fração posterior, que correspondia majoritariamente ao β -MSH. O peptídeo majoritário determinado nas frações 13 e 14 (β -MSH) foi sintetizado e testado em relação à ativação de ERK 1,2 e bloqueio da indução de ciclina D1 por FGF2. Não houve nenhum efeito de β -MSH sobre ERK 1,2 ou ciclina D1, indicando que o componente majoritário das frações 13 e 14 não é o responsável pelas respostas observadas anteriormente.

Devido a esses problemas, fez-se novo fracionamento (**fig. 26**), desta vez alterando-se os parâmetros de HPLC. Ao invés de um gradiente linear de solvente utilizou-se uma isocrática em um trecho da corrida, para separar melhor a fração de interesse. A resolução dos picos apresentou melhor qualidade, podendo isolar-se uma fração com um único pico de massa

Figura 26: Cromatograma do segundo fracionamento da Corticotropina A. Gradiente linear até 40 min. e isocrática entre 40 e 50 min. Gradiente linear até o final da corrida. O eixo das abcissas corresponde ao tempo de retenção em minutos. Os números correspondem às frações que apresentaram atividade.

As frações de interesse foram isoladas e submetidas a espectrometria de massa, e observou-se que as frações 13 e 14 correspondiam ao β -MSH e a fração 24 correspondia ao ACTH₁₋₃₉. A fração 5/6 apresentou um pico majoritário de massa de 1216, mas não apresentou atividade, indicando que o(s) componente(s) responsáveis pela ativação de ERK 1,2 e bloqueio de ciclina D1 encontra(m)-se nas frações 13 e 14.

V.6 - Busca de Peptídeos Ativos em Células Adrenais

Devido ao método de extração do ACTH hipofisário (extrato ácido de hipófise porcina) na preparação de corticotropina A (**Sigma**), além de produtos de clivagem do POMC, provavelmente existem outros peptídeos hipofisários contaminantes, intactos ou fragmentos, presentes na preparação da corticotropina A. Por esta razão foram testados peptídeos conhecidos, hipofisários ou não (α -MSH, Bombesina, CRF, CLIP, Oxitocina, Vasopressina, Angiotensina I e Angiotensina II) para verificar a ativação de ERK 1,2 e bloqueio da indução de ciclina D1. Os peptídeos utilizados foram sintetizados pela Profa. Maria Aparecida Juliano, da Escola Paulista de Medicina ou comprados da Sigma. A Tabela 1 resume os resultados.

Tabela 1: Atividade de peptídeos em células Y-1

Peptídeo	Fosforilação de ERK 1,2	Bloqueio da indução de ciclina D1 por FGF2
Vasopressina	+++	+++
Oxytocina	+++	+
α-MSH	-	-
β-MSH	+	-
CRF	-	-
CLIP	-	-
Ang I	+	-
Ang II	+	-
Bombesina	-	-

C – células carenciadas não tratadas

F – células tratadas com FGF-2

V – células tratadas com vasopressina

Figura 27: Western blot. Teste de atividade de peptídeos sintéticos para ativação de ERK 1,2 em células Y-1 carenciadas para soro. **A** - ERK 1,2 total; **B** - ERK 1,2 fosforilada.

Figura 28: Western blot. Teste dos peptídeos CLIP e CRF para ativação de ERK 1,2 em células Y-1 carenciadas para soro. **A** - ERK 1,2 total; **B** - ERK 1,2 fosforilada.

Figura 29: Western blot. Curva de dose de vasopressina e oxitocina na fosforilação de ERK1,2 em células Y-1 carenciadas para soro. **A** - ERK 1,2 total; **B** - ERK 1,2 fosforilada.

Dentre estes peptídeos, vasopressina tornou-se especialmente interessante. Vasopressina é um neuropeptídeo que tem função antidiurética e é descrito por sua atividade em células da hipófise e da adrenal, apresentando diferentes tipos de receptores. Em células adrenais, os receptores são do tipo V1a, e o hormônio atua via PKC (Houben et al, 1994; Guillon et al, 1998).

A **fig.29** mostra que a fosforilação de ERK1,2 por vasopressina ocorre até 10⁻¹⁰ M, enquanto que a fosforilação de ERK 1,2 por oxitocina só ocorre em concentrações farmacológicas (10⁻⁸ M).

Em relação à expressão de ciclina D1, vasopressina apresenta forte efeito de bloqueio sobre a indução de ciclina D1 por FGF2 (**fig. 30 e 31**) tanto em concentrações farmacológicas quanto fisiológicas.

Figura 30: Imunocitoquímica. Vasopressina induz fracamente ciclina D1 em células Y-1 carenciadas para soro, mas bloqueia fortemente o efeito de indução de ciclina D1 por FGF-2. Concentração de vasopressina – 10^{-6} M.

Figura 31: Western blot. Curva de dose de vasopressina para a inibição de ciclina D1 induzida por FGF-2 em células Y-1 carenciadas para soro.

A **figura 32** mostra que oxitocina só bloqueia a indução de ciclina D1 por FGF-2 em altas concentrações (10^{-6} M), indicando que, nesta concentração, oxitocina provavelmente esteja mimetizando vasopressina na interação com o receptor de vasopressina.

Figura 32: Western blot. Curva de dose de oxitocina para a inibição de ciclina D1 induzida por FGF-2 em células Y-1 carenciadas para soro.

Diferente de Corticotropina A, que só tem efeito de bloqueio de ciclina D1 quando adicionada simultaneamente a FGF-2, vasopressina tem efeito inibitório na indução de ciclina D1 tanto se a adição for feita juntamente com FGF-2 ou após pulso de 2h de FGF-2. Esse efeito pode ser observado nos níveis de proteína e mRNA (**fig. 33**).

33A

33B

Figura 33: Vasopressina (10^{-6} M) bloqueia a indução de ciclina D1 por FGF2 em células Y-1 carenciadas para soro em qualquer período de G1. **A** - Western blot; **B** - Northern blot.

Além disso vasopressina também bloqueia a indução de c-Fos e c-Myc por FGF-2 (figs. 34 e 35). Interessantemente, as curvas de dose para bloqueio de c-Fos e c-Myc são contraditórias. No caso de c-Fos, vasopressina parece estar agindo via dois receptores distintos, uma vez que apresenta efeito estimulatório em concentrações farmacológicas (10^{-6} M) e efeito inibitório em concentrações fisiológicas (10^{-12} M). No caso de c-Myc, tanto o efeito estimulatório como o de bloqueio são farmacológicos. O efeito estimulatório é concordante com c-Fos, mas o efeito de bloqueio é contraditório.

Western blot

Imunocitoquímica

Figura 34: Vasopressina induz a expressão de c-Fos em concentrações altas (10^{-6} M) e bloqueia a indução de c-Fos por FGF2 em células Y-1 carenciadas para soro. O efeito é dual em função da concentração de vasopressina.

Figura 35: Imunocitoquímica. Vasopressina induz a expressão de c-Myc em concentrações altas (10^{-6} M) e bloqueia a indução de c-Myc por FGF2 em células Y-1 carenciadas para soro. O efeito é proporcional à concentração de vasopressina.

Vasopressina também tem efeito de bloquear o estímulo da entrada em S por FGF2 (fig. 36).

Figura 36: Incorporação de BrdU. Média de dois experimentos. Vasopressina (10^{-6} M) bloqueia a entrada em S estimulada por FGF2 em células Y-1 carenciadas para soro, tanto quando adicionada simultaneamente a FGF2 quanto quando adicionada no

final de G1. ACTH não tem efeito na expressão de ciclina D1, mas inibe a expressão de c-Myc, bloqueando o ciclo celular de células Y-1. Vasopressina, ao contrário, inibe a expressão de ciclina D1 sem ter efeito inibitório importante na indução de c-Fos e c-Myc mas, como ACTH, bloqueia a entrada em S promovida por FGF-2. Portanto, a inibição da expressão de ciclina D1 pode ser um (ou o) mecanismo pelo qual vasopressina bloqueia o ciclo celular em células Y-1. Se esta hipótese estiver correta, espera-se que clones de células Y-1 que superexpressam ciclina D1 sejam resistentes ao bloqueio do ciclo celular por vasopressina, mas não por ACTH. Esta hipótese foi testada e confirmada, como mostra a **figura 37**.

Figura 37: Incorporação de BrdU. O efeito inibitório de vasopressina (10^{-6} M) sobre a entrada em S estimulada por FGF-2 é muito menor em clones que superexpressam ciclina D1. O efeito inibitório de ACTH sobre FGF2 no clone é similar ao efeito em células Y-1.

Em clones que superexpressam ciclina D1 o efeito de bloqueio do ciclo celular por vasopressina é muito menor que na linhagem parental. No entanto o efeito de bloqueio do ciclo celular por ACTH permanece similar àquele observado na linhagem parental.

VI - DISCUSSÃO

O estudo da interação entre FGF-2 e ACTH no controle da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em células Y-1 (Armelin et al, 1996; Kimura et al, 1993; a, b-Lotfi et al, 2000) tem dois propósitos: 1) definir o papel de ACTH no controle da proliferação, e os respectivos mecanismos; 2) estabelecer os componentes e as reações da via regulatória que controla a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em células adrenocorticais, e buscar outros peptídeos ativos em células adrenais.

A motivação original dos objetivos desta tese decorreu dos resultados de nossos estudos iniciais sobre o papel de ciclina D1 no controle da regulação da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em Y-1 (Telma Tiemi Schwindt, dissertação de mestrado, 1998). Estes resultados tinham duas implicações principais: células Y-1 bloqueadas em $G0$ mostram níveis negligenciáveis de ciclina D1, induzida por FGF-2, sugerindo que a expressão de ciclina D1 é uma etapa importante na transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ destas células; uma preparação comercial de ACTH natural extraída de hipófise porcina, denominada corticotropina A, bloqueia a indução de ciclina D1 por FGF-2, indicando que ciclina D1 pode ser um alvo importante na regulação da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ por sinais extracelulares.

Assim, os objetivos principais deste trabalho eram: a) definir o papel de ciclina D1 no circuito regulatório da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ de células adrenocorticais Y-1 e b) buscar peptídeos que interferem com a indução de ciclina D1 por FGF-2, estabelecendo seus mecanismos de ação. Partindo de dados conhecidos de que o mRNA e a proteína ciclina D1 são ambos de alto "turnover", a expressão da proteína inicia-se no meio de $G1$, e a transcrição é o ponto principal do controle da expressão (Bakiri et al, 2000) os objetivos gerais desta tese foram delimitados. Além disso, no decorrer dos últimos 3 anos, resultados de diversos laboratórios (inclusive desta tese) contribuíram

para consolidar o paradigma envolvendo ciclina D1 como intermediário entre os genes de resposta primária e o sistema Rb-ciclina E-CDK2.

Outros subprojetos desenvolvidos paralelamente em nosso laboratório mostraram que há dois alvos importantes nos mecanismos anti-mitogênicos de ACTH: a proteína c-Myc, cuja degradação é acelerada e a enzima Akt/PKB, que é desativada por desfosforilação. Esta tese mostra definitivamente que ACTH não interfere com a expressão de ciclina D1, seja o mRNA ou a proteína. Mas os resultados aqui apresentados vão além disso. Mostramos que em células Y-1 a indução da transcrição de ciclina D1 é dependente de síntese de proteína, portanto o gene de ciclina D1 é de resposta secundária. Sua indução por FGF-2 depende de ERK e PI3K, mas c-Myc não é necessária. Por outro lado, a expressão dos genes *c-fos* e *c-jun* não é suficiente para garantir a indução de ciclina D1, uma vez que ACTH induz c-Fos e c-Jun mas não induz e não inibe a expressão de ciclina D1. Esta tese consolida o seguinte esquema:

Figura 38: esquema da ativação do sistema Rb/ciclina E/CDK2 mediada por ciclina D1.

Apesar dos resultados não mostrarem diretamente que c-Fos e c-Jun são necessários para a indução de ciclina D1, sabe-se que AP-1 é um fator de

transcrição de ciclina D. Sendo a indução de ciclina D1 dependente de síntese de proteína, pode-se deduzir que a indução de c-Fos e c-Jun seja necessária para a transcrição de ciclina D1 em células Y-1. A indução de c-Fos e c-Jun é necessária à indução de ciclina D1, mas pode não ser suficiente. ACTH provavelmente tem outros efeitos. Porém estas hipóteses não foram exploradas.

Este trabalho mostra que a indução de ciclina D1 é suficiente para eliminar o bloqueio da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ por $p27^{Kip1}$ em células Y-1.

Não foi possível identificar o(s) peptídeo(s) componente(s) minoritário(s) da corticotropina A que causa(m) bloqueio da indução de ciclina D1 por FGF-2. Mas mostramos que vasopressina tem uma ação semelhante, consolidando a noção de que ciclina D1 é alvo importante na regulação da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$. Uma vez que vasopressina ativa ERK 1,2 e bloqueia a indução de ciclina D1 por FGF2, tornou-se importante verificar se vasopressina estaria bloqueando a atividade de PI3K, enzima necessária à indução de ciclina D1 e, conseqüentemente, à progressão através da fase G1 do ciclo celular. Como medida indireta da ativação de PI3K, células Y-1 carenciadas para soro foram tratadas com vasopressina e analisadas quanto à fosforilação de Akt.. Observou-se que vasopressina não altera o nível de fosforilação basal de células Y-1 carenciadas para soro, e também não interfere com os efeitos de ACTH, dcAMP e forskolina, que causam defosforilação de Akt. No entanto, o forte efeito de indução da fosforilação de Akt por FGF-2 é inibido por vasopressina. Estes resultados indicam que o alvo de vasopressina está "downstream" a PI3K. Todos os experimentos de medida de fosforilação de Akt foram realizados por Fábio Luís Forti em nosso laboratório.

As propostas desta tese, juntamente com outros subprojetos de nosso laboratório, resultam no primeiro esquema abrangente do circuito de transdução de sinais que regulam a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em células Y-1 e células adrenais em geral. Resta validar estes resultados e suas interpretações em outras linhagens ou em culturas primárias de células adrenocorticais. A **figura 39** resume as principais vias de sinalização envolvidas no controle da proliferação celular de Y-1 por FGF-2, ACTH e vasopressina.

VII – CONCLUSÕES

1 - Ciclina D1 desempenha um papel central nos circuitos regulatórios que controlam a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em células adrenocorticais Y-1, sendo um intermediário entre os genes de resposta primária e o sistema Rb/ciclina E/CDK2, conforme esquematizado na **figura 38**.

2 - A indução tardia do gene de ciclina D1 por FGF-2 é um processo dependente de síntese de proteínas. Entre as proteínas codificadas pelos genes de resposta primária diretamente induzidos por FGF-2, c-Myc não é necessária para a indução de ciclina D1. Por outro lado, proteínas das famílias Fos e Jun podem ser necessárias, embora não suficientes, para induzir ciclina D1. Mas, independentemente destas relações, c-Fos, c-Jun, c-Myc e ciclina D1 são complementares e absolutamente necessários para a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em células Y-1.

3 - O bloqueio da expressão de ciclina D1 é suficiente para bloquear a transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ em células Y-1. Este fato é claramente observado pelo mecanismo anti-mitogênico desencadeado por vasopressina, antagonizando o efeito mitogênico de FGF-2.

4 - Segundo resultados de outros subprojetos de nosso laboratório, a ação anti-mitogênica de ACTH envolve um mecanismo que promove degradação da proteína c-Myc e indução de $p27^{Kip1}$, através de cAMP/PKA. Contudo os resultados desta tese mostram que a inibição do ciclo celular por $p27^{Kip1}$ é superada pela superexpressão de ciclina D1.

Figura 39: Vias de sinalização através de RTKs (FGF-2) e GPCRs (ACTH e vasopressina), indicando que há convergência de várias vias para a expressão de genes importantes na transição G1→S do ciclo celular.

VIII - REFERÊNCIAS

Adari H., Lowy, D.R., Willumsen B.M., Der C.J. & McCormick F., *Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain*, Science, 240, 518-521, (1988)

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

Armelin M.C.S., Gambarini A.G. & Armelin H.A., *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, (1977)

Avruch, J. Zhang, X., Kyriakis, J. M., *Raf meets Ras, completing the framework of a signal transduction pathway*. TIBS, 19, 279-283 (1994)

Bakiri L., Lallemand D., Bossy-Wetzel E. & Yaniv M., *Cell-cycle-dependent variations in c-jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression*, EMBO J., 19, 2056-2068, (2000)

Barbacid M., *ras genes*, Ann. Rev. Biochem., 56, 779-827, (1987)

Bartek J., Lukas J. & Bartkova J., *Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the D-cyclin dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint*, Mol. Cell. Biol., 16(12), December, 6917-6925, (1996)

Bigorgne J.C. & Corvol P., *Presence of renin, angiotensinogen, and converting enzyme in human pituitary lactotroph cells and prolactin adenomas*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 63:231-237, (1986)

Birnbaumer M., *Vasopressin receptors*, Trends Endocrinol. Metab., 11(10), 406-410, (2000)

Boguski, M. S., McCormick, F., *Protein regulating Ras and its relatives*. Nature, 366, 643-654, (1993).

Bos J.L. & Burgering B.M.T., *Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat*, TIBS 20, January, 18-21, (1995)

Bos J.L., *A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB*, Trends Biochem. Sci., 20, 441-442, (1995)

Campbell, S. L, Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., Der, C. J., *Increasing complexity of Ras signaling*, Oncogene, 17, 1395-1413, (1998).

Chan T.O., Rittenhouse S.E. & Tsichlis P.N., *AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation*, Annu Rev Biochem., 68:965-1014, (1999)

Clapham D.E., *Calcium signaling*, Cell, 80(2):259-268, (1995)

Clustal W, (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

Coffer P., Jonge M., Mettouchi A., Binetruy B., Ghysdael J. & Kruijer W., *junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2*, *Oncogene*, 9, 911-921, (1994)

Cooper G.M., Aktas H. & Cai H., *Ras links growth factor signalling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the CDK inhibitor p27^{KIP1}*, *Mol. Cell. Biol.*, 17(7), 3850-3857, (1997)

Darnell J.E. et al, *Mol. Cell. Biol.*, 4th edition, Scientific American Books Inc., (1997)

Diaz-Meco M.T., Lozano J., Municio M.M., Berra E., Frutos S., Sanz L. & Moscat J., *Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta*, *J. Biol. Chem.*, 269, 31706-31710, (1994)

Forti F.L. & Armelin H.A., *ACTH inhibits a Ras-dependent anti-apoptotic and mitogenic pathway in mouse Y-1 adrenocortical cells*, *Endocr. Res.*, 26(4), 911-914, (2000)

Ghosh P.M., Mikhailova M., Bedolla R. & Kreisberg J.I., *Arginine vasopressin stimulates mesangial cell proliferation by activating the epidermal growth factor receptor*, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 280(6), 972-979, (2001)

Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C, Boccara G, Derick S, Chouinard L, Gallo-Payet N., *Vasopressin : a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions.*; Endocr Res Aug-Nov;24(3-4):703-10, 1998

Guttridge D.C., Albanese C., Reuther J.Y., Pestell R.G. & Baldwin A.S. Jr., *NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1*, Mol. Cell. Biol., 19, 5785-5799, (1999)

Guyton A.C., *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*, 4^a ed., Editora Guanabara S.A., (1989)

Hagiwara M., Brindle P., Harootunian A., Armstrong R., Rivier J., Vali W., Tsien R. & Montminy M.R., *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, (1993)

Hall M., Bates S. & Peters G., *Evidence for the different modes of action of cyclin dependent kinases inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins*, Oncogene, 11, 1581-1588, (1995)

Hawkins P.T., Jackson T.R. & Stephens L.R., *Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase*, Nature, 358, 157-159, (1992)

Heldin C.H. & Purton M., *Signal Transduction*, 1st edition, Chapman & Hall, (1996)

Hofer, F., Fields S., Schneider C. & Martin G.S., *Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*, Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 11089-11093, (1994)

Houben H. & Denef C., *Bioactive peptides in anterior pituitary cells*, Peptides, 15(3), 547-582, (1994)

Jeffrey P.D., Russo A.A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massagué J. & Pavletich N.P., *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex*, Nature, 376, 313-320, (1995)

Kimura E., Armelin M.C.S. & Armelin H.A., *Isolation and characterization of variant clones resistant to ACTH from Y-1 mouse adrenocortical carcinoma lines*, Rev. Bras. Gen., 2, 211-227, (1983)

Kimura E. & Armelin H.A., *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, (1988)

Kimura E., Sonobe M.H., Armelin M.C.S. & Armelin H.A., *Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester but not by 3'5'-cyclic adenosin monophosphate derivatives*, Mol. Endoc., 7, 1463-1471, (1993)

Klingler C., Ancellin N., Barrault M.B., Morel A. & Corman B., *Potentiation of receptor-mediated cAMP production: role in the cross-talk between vasopressin V1a and V2 receptor transduction pathways*, Biochem. J., 330, 1023-1028, (1998)

Krasilnikov M.A., *Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation*, Biochemistry (Moscow), 65(1), 68-78, (2000)

L'Allemain G., Lavoie J.N., Rivard N., Baldin V. & Pouyssegur J., *Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts*, Oncogene, 14(16), April, 1981-1990, (1997)

Lepique A.P., Forti F.L., Moraes M.S. & Armelin H.A., *Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2*, Endocr Res., Nov;26(4):825-32, (2000)

Lotfi C.F.P., Todorovic Z., Armelin H.A. & Schimmer B.P., *Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y-1 mouse adrenocortical tumor cells*, J. Biol. Chem., 272(47), November, 29886-29891, (1997)

(a) Lotfi CF, Lepique AP, Forti FL, Schwindt TT, Eichler CB, Santos MO, Rebutini IT, Hajj GN, Juliano L, Armelin HA, *Proliferative signaling initiated in ACTH receptors*, Braz J Med Biol Res. Oct;33(10):1133-40, (2000)

(b) Lotfi, C.F.P., Costa E.T., Schwindt T.T. & Armelin H.A., *Role of ERK/MAP kinase in mitogenic interaction between ACTH and FGF2 in mouse Y1 adrenocortical tumor cells*, Endocr Res. Nov;26(4):873-7, (2000)

Lotfi C.F.P. & Armelin H.A., *c-fos and c-jun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells*, J. Endocrinol. Mar;168(3):381-389, (2001)

Macara, I. G., Lounsbury, K. M., Richards, S. A., McKiernan, C. M., Bar-Sagi, D, *The Ras superfamily of GTPases*, FASEB J., 10, 625-630, (1996)

Marrero M.B., Paxton W.G., Duff J.L., Berk B.C. & Bernstein K.E., *Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells*, J. Biol. Chem., 269(4):10935-10939, (1994)

Matsushime H., Roussel M.F., Ashmun R.A. & Sherr C.J., *Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle*, Cell, 65, 701-713, (1991)

McMahon M., Woods D, Parry D., Cherwinski H., Bosch E. & Lees E., *Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21^{Cip1}*, Mol. Cell. Biol., 17(9), September, 5598-5611, (1997)

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

Morgan D.O., *Principles of CDK regulation*, Nature, 374, March, 131-134, (1995)

Nishizuka Y., *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promoter*, Nature, 308, 693-698, (1984)

Ornitz D.M. & Itoh N., *Fibroblast growth factors*, Genome Biology, 2(3), 3005.1-3005-12, (2001)

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

Perez-Roger I., Kim S.H., Griffiths B., Sewing A. & Land H., *Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1)*, EMBO J., 18, 5310-5320, (1999)

Reddy G.P., *Cell cycle: regulatory events in G1→S transition of mammalian cells*, J. Cell. Biochem., 54, 379-386, (1994)

Rodriguez V.P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D. and Downward J., *Phosphatidylinositol 3-OH kinase as a direct target of Ras*, Nature, 370, 527-532, (1994)

Russell M., Lange C.C. & Johnson G.L., *Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen activated protein kinase kinase kinase (MEKK1)*, J. Biol. Chem., 270, 11757-11760, (1995)

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

Scheid M.P. & Woodgett J.R., *PKB/AKT: functional insights from genetic models*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., Oct 2(10), 760-768, (2001)

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

Schramm M. & Selinger Z., *Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system*, Science, 225, 1350-1356, (1984)

Sherr C.J., *D-type cyclins*, TIBS, 20(5), May, 187-190, (1995)

Stryer L., *Biochemistry*, 3rd edition, W.H. Freeman and Company/N.Y., (1988)

Uhler M.D. & McKnight G.S., *Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase*, J. Biol. Chem., 262, 15202-15207, (1987)

Van Aelst, L., Barr M., Marcus S., Polverino A. & Wigler M., *Complex formation between Ras and Raf and other protein kinases*, Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 6213-6217, (1993)

Vanhaesebroeck B., Leivers S.J., Panayotou G. & Waterfield M.D., *Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers*, Trends Biochem. Sci., 22, 267-272, (1997)

Vlach J., Hennecke S., Alevizopoulos K., Conti D. & Amati B., *Growth arrest by the cyclin dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} is abrogated by c-Myc*, The Embo Journal, 15(23), 6595-6604, (1996)

Vojtek, A. B., Der, C. J., *Increasing complexity of the Ras signaling pathway*, The Journal of Biological Chemistry, 273 (32), 19925-19928, (1998)

Weinberg R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*, Cell, 81, May, 323-330, (1995)

(a) Weinberg R.A., *E2F and cell proliferation: a world turned upside down*, Cell, 85, May, 457-459, (1996)

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

Weinstein I.B., Imoto M., Doki Y., Jiang W. & Han E.K., *Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events*, Exp. Cell. Res., 236(1), October, 173-180, (1997)

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

Zhang, F. L., Kirschmeier, P., Carr, D. James, L., Bond. R. W., Wang, L., Patton, R., Windsor, W. T, Syto, R., Zhang, R., Bishop, W. R., *Characterization of Ha-Ras, N-Ras, Ki-Ras4A and Ki-Ras4B as in Vitro Substrates for Farnesyl Protein Transferase and Geranylgeranyl Protein Transferase Type I*, J. Biol. Chem., 272(15), 10232-10239, (1997)

Zohn I.E., Xiong H. Y., Cox A.D. & Earp H.S., *Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase*, Mol. Cell. Biol., 15(11):6160-6168, (1995)