UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Papel de BRG1 e Brm, Reguladores Globais de Transcrição, na
Reversão Fenotípica de células ST1 pela ação de Glicocorticóides**

Fernanda Ortis
Tese de Doutorado

Mari Cleide Sogayar

SÃO PAULO
Data do Depósito do Trabalho na SPG: 10/7/02
(10 de Julho de 2002)

“Quando poi davanti a te si apriranno tante strade e non saprai quale prendere, non imboccarne una a caso, ma siediti e aspetta. Respira con la profondità fiduciosa con cui hai respirato il giorno in cui sei venuta al mondo, senza farti distrarre da nulla, aspetta e aspetta ancora. Stai ferma, in silenzio, e ascolta il tuo cuore. Quando poi ti parla, alzati e va’ dove lui ti porta.”

“Quando então em frente a você se abrirem muitas estradas e não souber qual escolher, não pegue qualquer uma ao acaso, mas sente-se e espere. Respire com a profundidade confiante com que respirou no dia em que veio ao mundo, sem se distrair com nada, espere e espere ainda. Fique parada, em silêncio, e escute o seu coração. Quando ele te falar, levante-se e vá para onde ele te leva.”

Susanna Tamaro

(Va’ Dove ti Porta il Cuore)

**Aos meus pais, pelo apoio, amor e
principalmente, pela minha vida**

**Ao Ale,
para onde meu
coração me levou.....**

**À minha família, por existir e
sempre estar por perto**

Agradecimentos

À Dra Mari Cleide Sogayar, por acreditar e investir em mim durante todos estes anos, compartilhando sua rica experiência e entusiasmo científico.

À Dra Celine Pompéia, pela oportunidade de aprender a fazer ciência ao seu lado e pelos bons momentos.

Ao Ricardo L. Vila, pelo intercâmbio, bom humor e por ter sido o primeiro.

Ao Antero F.A. Macedo, "meu filho", pelo otimismo, e por ter sido o segundo.

Aos Dois, pela ajuda, paciência e carinho.

Aos grandes amigos: Sheila M. Brochado, Theri L. Degaki, Marcos A.A. Demasi, Fernando H. Lojudice, Leonardo de O. Rodrigues pelo auxílio fundamental e generoso, nos experimentos e na vida.

Ao Christian Colin, pela motivação e incentivos incansáveis, pela amizade e carinho e pela ajuda constante e incondicional.

À Fernanda Festa, Irenice C. da Silva, Luciana O. Cruz, Ana Paula G. Hasegawa, Ariadne H. P. Quinete, Juan Carlos Bustos e Carlos A. M. Aita, pela importante ajuda em experimentos e pela convivência.

À Theri ("5S"), Marcos, Sheilinha, Léo ("o legal"), Colin e Leticia Labriola pela leitura, correções e sugestões nesta Tese,

e ao querido Wagner R. Montor pelas "muitas" correções de inglês.

Ao Dr. José Mauro Granjeiro, pela insanidade contagiante e otimismo eletrizante, inspiração para todos nós.

Aos amigos do início da vida científica neste laboratório, com os quais compartilhei os primeiros passos e compartilho grandes amizades: Maria Leonor S. Oliveira (Léo), Zizi, Regina Maki Sasahara (Makelina), Lúcia Helena (LuHe) e Renato Alvarenga (Sr. Renato), ... "Não adianta nem tentar me esquecer....".

Aos amigos do laboratório: Ana Paula, André Fujita, Ant, Ariadne, Áurea V.F. Flatschart, Carlos, Chris, Cleber Vedoy, Débora C. Costa, Diana N. Nunes, Elizabeth M. Oliveira, Fernanda Festa, Fernando, Helena M. F. Ribeiro, Irê, Jean F. Barreto, Karin Krogh, Katlin B. Massirer, Léo, Leticia, Lúcia Helena S. Carvalho, Luciana O. Cruz, Marcos, Mário H. Bengtson, Rita de Cássia Figueira, Sandra Regina de Souza, Sheila, Tatiana C. S. Corrêa, Theri, Thiago M. Inocêncio, Wagner e, claro, Zizi de Mendonça, pelas dicas de bancada, companheirismo, amizade e muita "chacrinha".....

Àqueles que não estão mais no laboratório mas foram importantes para minha formação científica e pessoal: Maria Lúcia Corrêa-Giannella, Silvia Stuchi Maria Engler, Claudio Mortensen; João Marcos M. Mercado, Sandro Valentini, Cassandra Corvello, Carmem Lucia, Marina Bongioanni, Beatrice Lépine, Vanda A.T. Silva e Monica Rufino.

Ao Dr. Hugo Armelin e ao Amigos do seu laboratório, pelas trocas de informações, materiais, equipamento e discussões estimulantes nos seminários de sexta-feira.

Aos Laboratórios dos Drs. Paulo Lee Ho, Hamza El-Dorry e Pio Colepicolo pelo uso de materiais e equipamentos.

Aos amigos, em especial à Alessandra Kupper (Ale), longe mas sempre presente.

Às amigas Cherri, She e Cora, pelo companheirismo e amizade.

À Dra Glaucia Santelli, por me iniciar na "vida científica".

À Zizi, Sandrinha, Dé, Irê, Tati e D. Helena, pelo importante apoio técnico.

Ao Dr. Lawrence Banks e pessoal do seu laboratório, Aga Bernat, Ernesto Guccione, Christian Kühne, Fiamma Mantovani, Paola Massimi, Dave Pim, Tultsi Prathapam e Miranda Thomas, por me receberem em seu laboratório e compartilharem seu conhecimento generosamente.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

ICGEB – International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.

CABBIO – Centro Argentino-Brasileiro de Biotecnologia.

FBB – Fundação Banco do Brasil

PRL-USP – Pró-Reitoria de Pesquisa – USP.

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

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

Índice de Figuras

Figura 1. Representação das fases do Ciclo Celular.	2
Figura 2. Teoria da Simbiose Funcional entre remodeladores de cromatina dependentes de ATP e Histonas Acetilases.	7
Figura 3. Proteínas homólogas de SWI2/SNF2, componentes com atividade helicase dos complexos remodeladores de cromatina SWI/SNF.	11
Figura 4. O complexo SWI/SNF no ciclo celular.	15
Figura 5. Remodelamento da Cromatina por interação de GR com o complexo multiprotéico SWI/SNF	21
Figura 6. Esquema da sub-clonagem do fragmento EcoRI-HindIII de hBRG1 (1,5 kpb) no vetor de expressão pET32c.	49
Figura 7. Diagnóstico de restrição do DNA plasmideal do clone pET-hbrg.	50
Figura 8. Seqüência senso do fragmento de hBRG1, subclonado no vetor pET32.	51
Figura 9. Seqüência do fragmento de hBRG1, sub-clonado no vetor pET32c	53
Figura 10. Análise da expressão e purificação da proteína Trx-Brg	55
Figura 11. Western blot para confirmar a expressão de proteínas de fusão com cauda de histidina no sistema	56
Figura 12. Analise das etapas de purificação da proteína Trx-Brg	59
Figura 13. Western blot para análise da reatividade do antisoro anti-Brg contra a proteína recombinante Trx-Brg	62
Figura 14. Western blot de extratos protéicos celulares para avaliar a reatividade do antisoro anti-BRG (1 ^a coleta) contra a proteína BRG1 celular	64
Figura 15. Western blot de extratos protéico celulares para avaliar a reatividade do antisoro anti-BRG (3 ^a coleta) contra proteínas celulares BRG e Brm	65
Figura 16. Western blot para comprovar a especificidade da reatividade do antisoro anti-Brg contra a proteína celular em HeLa.	67
Figura 17. Quantificação da proteína Brm em fibroblastos de camundongo	68
Figura 18. Imunoprecipitação das proteínas homólogas em mamífero de SWI2/SNF2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), pelo antisoro anti-Brg	70
Figura 19. Imunoprecipitação das proteínas homólogas de SWI2/SNF2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) utilizando lisados de células B61 e A31.	72
Figura 20. Análise da composição do complexo SWI/SNF em células ST1 e P7.	74
Figura 21. Imunoprecipitação da proteína pRB para identificação de proteína co-imunoprecipitadas.	76

Figura 22.	Western blot para análise da expressão das proteínas homólogas de rBRG1 e rBrm em células ST1 e P7.	79
Figura 23.	Quantificação da proteína Brm nas linhagens celulares ST1 e P7 antes e após tratamento com o hormônio Hy	80
Figura 24.	Níveis dos transcritos de <i>rbrm</i> nas linhagens celulares ST1 e P7, na presença e na ausência do hormônio Hy	82
Figura 25.	RT-PCR para amplificação dos fragmentos do cDNA correspondente a <i>rbrm</i> de células ST1 e P7	84
Figura 26.	Análise de seqüências consenso dos fragmentos 3-4,5 kpb de <i>rbrm</i> comparadas a seqüência humana depositadas em bancos de	85
Figura 27.	RT-PCR para comprovação da expressão de <i>hbrm</i> e <i>hBRG1</i> exógenos em clones P7.	87
Figura 28.	Western blot para comprovação da presença das proteínas exógenas hBrm e hBRG1 nos clones P7	89
Figura 29.	Morfotípia celular dos clones P7 transfectantes de pSVKS- <i>hbrm</i> .	91
Figura 30.	Perfil do crescimento dos clones P74 na presença e na ausência de tratamento com Hy	92
Figura 31.	Curva de crescimento do clone P74F e de células ST1.	93
Figura 32.	Número de colônias grandes formadas em substrato sólido, pelos clones P74.	95
Figura 33.	Diminuição do número de colônias formadas em substrato semi-sólido pelo clone P74F, após tratamento com Hy.	97
Figura 34.	Morfotípia celular dos clones P7 transfectantes de pSVKS- <i>hBRG1</i> .	99
Figura 35.	Perfil do crescimento dos clones P75 na presença e na ausência de tratamento com Hy	100
Figura 36.	Número de colônias formadas em substrato sólido, pelos clones P75.	102
Figura 37.	Morfotípia celular dos clones P7 transfectantes de pSVKS- <i>hBRG1</i> e <i>hbrm</i> .	104
Figura 38.	Perfil do crescimento dos clones P76 na presença e na ausência do tratamento com Hy	105
Figura 39.	Efeito do tratamento com Hy na morfotípia do clone celular P76E	107
Figura 40.	Número de colônias formadas em substrato sólido pelos clones P76	108
Figura 41.	Diminuição do número de colônias formadas em substrato semi-sólido pelo clone P76F, após tratamento com Hy.	109
Figura 42.	Identidade entre as regiões das proteínas hBrm e hBRG1	115
Figura 43.	Importância da região C-terminal da proteína Brm para reversão fenotípica de células transformadas por <i>ras</i> ativado.	123

Tabela 1: Comparação dos componentes dos complexos relacionados a SWI/SNF em levedura, Drosophila e humanos	9
Tabela 2: Rendimento (mg de proteína/l de suspensão bacteriana) de duas produções das proteínas Trx e Trx-Brg.	58
Tabela 3: Dados das coletas e imunizações de coelhas fêmeas com a proteína Trx-Brg:	60
Tabela 4: Comparação dos tempos de dobramento e densidade de saturação dos diferentes clones transfectantes de hBrm (P74) e controle (P73).	94
Tabela 5: Comparação do número de colônias formadas em substrato semi-sólido, entre os diferentes clones transfectantes de hBrm (P74), hBRG1 (P75) e ambos (P76), e os controles transfectantes de pSVKS (P73) e pX343 (P72).	96
Tabela 6: Comparação dos tempos de dobramento e densidade de saturação dos diferentes clones transfectantes de hBRG1 (P75) e controle (P73).	101
Tabela 7: Comparação dos tempos de dobramento e densidade de saturação dos diferentes clones transfectantes de hBRG1 e hBrm (P76) e controle (P73).	106

Os hormônios glicocorticóides (GCs) têm sido amplamente empregados como agentes antiinflamatórios e anti-tumorais. Sua ação ocorre via receptores nucleares (GR) sendo dependente da remodelação da estrutura da cromatina. As proteínas Brm e BRG1, componentes essenciais de um complexo regulador global da transcrição (SWI/SNF), por remodelamento da cromatina, exercem um papel-chave na ação de GR.

Para estudar o mecanismo de ação de GCs, foram utilizadas as linhagens celulares ST1 e P7, derivadas da linhagem celular C6, de glioma de rato. P7 é insensível ao tratamento com GC, enquanto ST1 apresenta reversão fenotípica tumoral→normal, gerando um bloqueio específico na fase G1.

Um anti-soro policlonal específico para Brm e BRG1, foi gerado através da inoculação de coelha com a proteína hBRG1 recombinante. Este antisoro foi utilizado para analisar os níveis destas proteínas nas duas linhagens celulares, sob ação de GC. Enquanto em ST1, Brm é induzida por GC, em células P7, o nível basal de Brm é relativamente alto, mantendo-se inalterado na presença de GC. A possibilidade de existirem mutações no gene *brm* de células P7, foi investigada através de amplificação do DNA, por PCR, e seqüenciamento.

A superexpressão de *brm* e *BRG1* em células P7 mostrou que clones isolados apresentavam, de um modo geral, achatamento celular, diminuição da taxa de crescimento e da eficiência de plaqueamento em substrato sólido e semi-sólido. Alguns destes clones passaram a responder ao tratamento com GC, porém não tão drasticamente como as células ST1. Co-imunoprecipitação mostrou algumas diferenças entre os complexos SWI/SNF de células ST1 e P7.

Glucocorticoid hormones (GCs) have been used as anti-inflammatory and anti-tumor agents, acting via nuclear receptors (GR) and being dependent on remodeling of the chromatin structure. As components of the global chromatin remodeling transcription complex (SWI/SNF), Brm and BRG-1 proteins play a key role in the action of GR.

In order to study the mechanisms of action of GCs, we have been using the ST1 and P7 cell lines, derived from the C6, a rat glioma cell line. P7 is insensitive to the GC treatment, while ST1 displays a complete phenotypic reversion from tumoral to normal, including a G1-specific block in the cell cycle.

A Brm and BRG1-specific polyclonal antiserum was generated, in rabbit, using recombinant hBRG1 protein as antigen. This antiserum was used to analyze the levels of Brm and BRG1 in these two cell lines, under GC treatment. While Brm is induced by GC, in ST1 cells, the basal level of Brm, in P7 cells, is relatively high, remaining unchanged under GC treatment. The possibility of *brm* mutations occurring in the P7 cells, was analyzed by DNA sequencing.

Overexpression of *brm* and *BRG1* in P7 cells led to morphological alterations (cell flattening) and decreased colony formation in agarose suspension and in solid substrate. Some of these clones became partially responsive to GC, when compared to the ST1 cell line. Co-immunoprecipitation assays revealed some differences in the SWI/SNF complex between ST1 and P7 cells.

Abreviaturas

36B4:	Fosfoproteína PO ribossomal ácida
AP-1:	Proteína Ativadora-1
ATP:	Trifosfato de adenosina
BAF:	Fatores Associados à BRG1
BSA:	Albumina Bovina Sérica
<i>BRG1</i> :	Gene relacionado ao <i>brahma</i>
<i>brm</i> :	gene <i>brahma</i>
Cdks:	Proteínas quinases dependentes de ciclinas
cDNA:	DNA complementar
CG:	Glicocorticóides
CIAP:	Fosfatase Alcalina de Intestino de Boi
CMV:	Citomegalovírus
CREB:	Proteína de ligação ao elemento responsivo a cAMP (CRE)
dCTP:	Trifosfato de desoxicitosina
ddNT:	didesoxinucleotideo
DMEM:	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
DNase:	Ácido desoxirribonuclease
dNTP:	desoxirribonucleotídeo
DO:	Densidade Óptica
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etileno dinitrilotetracético sal dissódico
EGTA:	Ácido etileno bisoxietilenonitrilo tetracético
Elk:	Proteína quinase de homologia a <i>ets</i>
GR:	Receptor de Glicocorticóides
GRE:	Elemento Responsivo à GR
HIV:	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV:	Papiloma vírus Humano
HSP:	Proteína de Choque Térmico
Hy:	Hidrocortisona
IgG:	Imunoglobulina G

IPTG:	beta-D-tiogalactopiranosídeo de isopropila
kDa:	Kilo Daltons
kpb:	kilo pares de base
LB:	Meio de Lauria-Bertani
MCS:	Sequência múltipla de clonagem
min:	minutos
MMTV:	Vírus do Tumor Mamário Murino
MOPS:	Ácido [3-N-morfolino] propano sulfônico
MW:	Peso Molecular
NF-kB:	Fator nuclear kappa B
NLS:	Sequência de Localização Nuclear
pb:	pares de bases
PCR:	Reação em cadeia da DNA polimerase
RNA_m:	RNA mensageiro
RB:	Gene de susceptibilidade ao retinoblastoma
RNA:	Ácido Ribonucléico
RNase:	Ácido Ribonuclease
SDS:	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB:	Soro Fetal Bovino
SSC:	Solução salina contendo Citrato de Sódio, pH 7,0
SSPE:	Solução salina contendo Sódio, Fosfato e EDTA, pH7,0
TAE:	Tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 7,5
TBE:	Tampão Tris-Borato-EDTA, pH8,3
TBS:	Tampão Tris-Salina, pH 7,5
TBST:	Tampão Tris-Salina-Tween, pH 7,5
TE:	Tampão Tris-EDTA, pH 7,5
Trx:	Tireodoxina
UV:	Luz ultravioleta

1.1. Controle da proliferação e diferenciação celular

O desenvolvimento normal de um organismo depende do balanço entre proliferação, diferenciação, senescência e morte celular. Os processos de proliferação e diferenciação celular em mamíferos são altamente regulados por fatores externos, tais como hormônios clássicos e fatores peptídicos de crescimento. Estes estímulos desencadeiam mecanismos intracelulares (revisto em Clapham, 1995; Heldin, 1995; Hill & Treisman, 1995 e Marshall, 1995) que levam à indução e/ou repressão da expressão de produtos gênicos específicos (como citocinas, oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor), assim como, síntese e/ou ativação de complexos regulatórios do ciclo celular (fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B, ciclinas, quinases dependentes de ciclinas e seus inibidores), levando à divisão ou diferenciação celular, dependendo do repertório de genes expressos (Armelin & Armelin, 1987, Armelin, 1990; Cross & Dexter, 1991; Herschman, 1991; Graña & Reddy, 1995 e Hill & Treisman, 1995). Alterações no padrão de expressão destes genes podem levar ao descontrole da proliferação celular e à transformação maligna (Herrlich & Ponta, 1989; Aaronson, 1991; Bishop, 1991 e Marx, 1994).

1.1.1. O controle do ciclo celular

O ciclo celular é um processo ordenado, através do qual a célula divide-se, produzindo duas células filhas com o mesmo repertório genético informacional (Murray & Hunt, 1993). A regulação da divisão celular é um processo crítico para o controle do desenvolvimento normal de um organismo. Após a decisão de progressão no ciclo celular, toda célula deve completar três passos fundamentais: replicação do DNA, segregação de seus cromossomos para as células filhas e citocinese. Durante o ciclo celular, podem ser distinguidas 4 fases principais (figura 1).

G₁ (“Gap1”) – Intervalo após a mitose durante o qual as células se preparam para iniciar a síntese de DNA. Este período é caracterizado pela transcrição e tradução de vários genes, levando à síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA.

S – Período no qual ocorre a duplicação de DNA celular.

G2 (“Gap2”) – Intervalo após a síntese de DNA, durante o qual as células se preparam para a citocinese.

M – Período mitótico, durante o qual a célula se divide mecanicamente, gerando duas novas células, com o mesmo conteúdo de DNA da célula-mãe.

Figura 1. Representação das fases do Ciclo Celular (ilustrado por George Eade).

Após a mitose, as células podem continuar no estado proliferativo, entrando novamente na fase G1, dependendo dos sinais extracelulares, como

fatores de crescimento mitogênicos, nutrientes e interações com o substrato, ou passar para um estado de quiescência, denominado G0.

O ciclo celular de todos os eucariotos é regulado por uma família de quinases dependentes de ciclina (CDKs). As CDKs promovem a progressão através de diferentes fases do ciclo celular, através da fosforilação de seus substratos. Sua atividade quinásica é dependente da presença de subunidades regulatórias, conhecidas como ciclinas, as quais, também, são controladas por fosforilação. A abundância de ciclinas específicas é controlada durante as fases do ciclo celular de acordo com o seu requerimento. Cada subunidade catalítica pode se associar a diferentes ciclinas, sendo que o complexo ciclina-CDK determinará quais proteínas serão fosforiladas.

O progresso ordenado pelo ciclo celular é bem regulado por mecanismos conhecidos como “checkpoints” (Hartwell & Weinert, 1989), os quais inibem o avanço para a próxima fase do ciclo, até que os eventos necessários para a progressão normal estejam prontos. Estes controles impedem, por exemplo, que danos ao DNA sejam propagados para as células filhas, bloqueando a divisão até que haja o reparo destes danos, ou, se não for possível o reparo, levando a célula à apoptose. A proteína supressora de tumor p53, por exemplo, exerce um papel importante na indução da morte celular, que ocorre devido a danos ao DNA (Lowe *et al*, 1993), assim como à parada em G1 (Kuerbitz *et al*, 1992).

1.1.2. Regulação da transição de G1 para S

A transição de G1 para fase S do ciclo celular é um ponto crítico no controle deste ciclo (Murray & Hunt, 1993; Sherr, 1994 e Nasmyth, 1996). O produto do gene supressor de tumor Rb, gene de suscetibilidade ao retinoblastoma (Friend *et al*, 1986 e Fung *et al*, 1987), exerce um papel importante no “checkpoint” da fase G1. Em organismos multicelulares, a entrada na fase S é dirigida por uma ação combinada de quinase dependente de ciclina D e quinase dependente de ciclina E. Como esperado, a atividade destas ciclinas é rigidamente controlada por fosforilação e degradação (mediada

por ubiquitinação), pela alteração no complexo das quinases e pela associação com moléculas inibitórias. A Ciclina D, por exemplo, é rapidamente sintetizada em células quiescentes após exposição a mitógenos, e os níveis de RNAm de ciclina E aumentam dramaticamente durante G1. Na metade de G1, o complexo ciclina D/CDK4/6, e posteriormente, (final da fase G1) o complexo ciclina E/CDK2, promovem a fosforilação e inativação do produto do gene supressor de tumor (pRb), Rb (Bartek *et al*, 1997; Kaelin, 1997; Sherr, 1996, Wang *et al*, 1994 e Dowdy *et al*, 1993), proporcionando a liberação de membros da família E2F de fatores de transcrição (revisado por King & Cidlowski, 1998, Jones & Kazlauskas, 2000 e Morris & Dyson, 2001). O fator E2F apresenta um importante papel no controle da transição G1 para S (revisado em Dyson, 1998 e Helin, 1998), regulando a transcrição de uma série de genes, que por sua vez, induzem a entrada em S. Dentre estes genes transcritos, estão os que exercem papel fundamental na síntese de DNA, como ribonucleotídeo redutase, DNA pol α e PCNA, e na progressão do ciclo, como aqueles que codificam para ciclina E, ciclina A e cdc2 (DeGregori *et al*, 1995; Dyson, 1998).

Estudos recentes mostraram que pRb, também se liga a histonas deacetilases, sugerindo que a repressão de E2F por pRb seja devida a alterações na estrutura da cromatina (Brehm *et al*, 1998; Luo *et al*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al*, 1998 e Zangh *et al*, 2000). Inibição de histonas deacetilases elimina a habilidade de pRb de reprimir diferentes fatores transcripcionais, já a ativação da transcrição por E2F é potenciada por CBP/P300 histona acetilase (Trouche & Kouzarides, 1996).

1.2. Controle da transcrição gênica por remodeladores de cromatina

O genoma de eucariotos, de um modo geral, é organizado em uma estrutura conhecida como cromatina. Esta estrutura é composta da molécula de DNA genômico associada a uma mesma massa de proteínas. As proteínas mais abundantes associadas com o DNA de eucariotos são as histonas, uma família de proteínas altamente conservadas ao longo da evolução, dentre as quais, as principais são H1, H2A, H2B, H3 e H4. O filamento de DNA (aproximadamente 146 pb) contorna, por duas vezes, um octâmero de histonas

(composto de 2 unidades de H2A; H2B; H3 e H4), numa estrutura conhecida como nucleossomo (Fletcher & Hansen, 1996; Wolffe & Hayes, 1999). Em cada um destes nucleossomos liga-se a histona H1, responsável por manter esta estrutura enovelada, permitindo a compactação do DNA, formando o cromossomo. As histonas são ricas em aminoácidos de carga positiva, os quais interagem com os grupos fosfato do DNA. Estas proteínas podem sofrer diversas modificações pós-traducionais, o que pode alterar sua afinidade à molécula de DNA, modulando a disponibilidade de acesso ao DNA para outras proteínas.

Sabidamente a cromatina é capaz de inibir a transcrição gênica devido a sua condensação em diferentes níveis, incluindo ativação da ligação, pré-iniciação de formação de complexos e elongação transcricional (revisado em Grunstein, 1997; Orlando & Paro, 1995; Paranjape *et al*, 1994; Wolffe, 1994; Wolffe, 1994 e Kingston *et al*, 1996). Os nucleossomos estão em constante estado de remodelamento, o que propicia ativação ou repressão da transcrição de regiões específicas do DNA (revisado em Urnov & Wolffe, 2001). Modificações dos componentes da cromatina também tem função regulatória na segregação de cromossomos, replicação, recombinação e reparo. Estes processos estão relacionados com modificações específicas da cromatina (Waterborg, 2000). As duas principais classes de remodeladores de cromatina são as proteínas que alteram a acetilação de histonas (Histonas acetiltransferases-HATs e Histonas deacetilases-HDATs) e complexos multiprotéicos, que são capazes de remodelar nucleossomos ou modificar seu espaçamento usando energia da hidrólise de ATP (revisado em Narlikar *et al*, 2002).

A acetilação de um resíduo de lisina, na região amino-terminal da cauda das histonas, diminui sua afinidade pelo DNA (Hong *et al*, 1993). Desta forma, as histonas acetilases alteram a conformação nucleossomal (Norton *et al*, 1989), aumentando o acesso de proteínas regulatórias transcricionais às regiões específicas do DNA (Lee *et al*, 1993; Vettese-Dadey *et al*, 1996 e Tse *et al*, 1998). Cromatina enriquecida em histonas acetiladas é mais eficientemente

transcrita (Ura *et al*, 1997; Nigtingale *et al*, 1998), já as histonas deacetilases são responsáveis por uma repressão da transcrição gênica, por fortalecer a compactação do DNA em nucleossomos. Tanto as histonas acetilases, como as deacetilases fazem parte de complexos protéicos ou interagem diretamente com proteínas relacionadas à transcrição gênica (Trouche & Kouzarides, 1996; Hsiek *et al*, 1999; Kundu *et al*, 1999; Ogryzko, 2001 e Zhong *et al*, 2002).

Os complexos remodeladores dependentes de ATP incluem duas classes maiores: complexos que contém a família das proteínas SWI2/SNF2 (SWI/SNF e RSC) e aqueles que contém ISWI (NURF, ACF e CHRAC). Estes complexos protéicos, que podem ativar ou reprimir a transcrição por interação com histonas e cromatina, interagem com fatores transcricionais, com a maquinaria basal de transcrição e com as histonas acetilases e deacetilases. Todos estes complexos possuem uma subunidade altamente conservada, de função similar à da proteína SWI2/SNF2 de levedura, possuindo um domínio ATPase dependente de DNA (Laurent *et al*, 1992; Tamkun *et al*, 1992; Kavary *et al*, 1993; Muchardt & Yaniv, 1993; Chiba *et al*, 1994). O complexo SWI/SNF de mamíferos altera a estrutura da cromatina e facilita a interação da maquinaria transcricional com o DNA nucleossomal *in vitro* (Kwon *et al*, 1994, Wang *et al*, 1996; Fryer & Archer, 1998 e DiRenzo *et al*, 2000).

Krebs *et al* (2000) sugerem uma simbiose funcional, entre complexos protéico remodeladores de cromatina dependentes de ATP e HATs, onde o complexo SWI/SNF estaria gerando uma torção na cromatina (Havas *et al*, 2000), gerando uma exposição das caudas de histonas, as quais podem ser acetiladas por HAT (figura 2), tornando o DNA acessível para transcrição.

Devido à importância do remodelamento da cromatina na regulação da transcrição gênica, o seu entendimento pode proporcionar conhecimentos importantes para o entendimento e a identificação de processos tumorigênicos (revisado em Wolffe, 2001).

1.3. Complexo Multiprotéico SWI/SNF

O complexo SWI/SNF é um ativador global da transcrição, por causar alterações na estrutura da cromatina, permitindo a interação de fatores transcripcionais com seqüências específicas do DNA. Este remodelamento é dependente da hidrólise de ATP, tendo sido inicialmente caracterizado em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Ster *et al*, 1984 e Peterson & Herkowitz, 1992), deficientes para o acasalamento (“matting type SWitching”-SWI) ou para a fermentação de sacarose (“Sucrose Non-Fermenting”-SNF).

Foram identificadas várias subunidades deste complexo (Hirschhorn *et al*, 1992; Cairns *et al*, 1994; Treich *et al*, 1995 e Cairns *et al*, 1996), dentre as

quais, encontra-se a proteína SWI2/SNF2, um componente essencial para a função deste complexo, por apresentar um domínio conservado, característico de ATPase dependente de DNA (helicases) (Davis *et al*, 1992 e Laurent *et al*, 1993). O complexo remodelador de cromatina, RSC (“Remodel the Structure of Chromatin”), também presente em *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta uma subunidade catalítica, com alta homologia com SWI2/SNF2. Foram relatados vários homólogos destes complexos em outras espécies como *Drosophila* (Papoulas *et al*, 1998) e humanos (Known *et al*, 1994; Nie *et al*, 2000; Xue *et al*, 2000 e Underhill *et al*, 2000) (Tabela 1). Estes complexos possuem algumas diferenças em seus componentes porém, todos apresentam uma subunidade com homologia a DNA helicase, apresentando atividade ATPásica (Tsukiyama & Wu, 1995; Vargas-Weisz *et al*, 1995 e Vargas-Weisz *et al*, 1997) (Tabela 1). Outras proteínas homólogas dos componentes presentes em SWI/SNF, foram identificadas em diferentes organismos como *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus* e mamíferos (Okabe *et al*, 1992; Tamkun *et al*, 1992; Chiba *et al*, 1994; Randazzo *et al*, 1994; Wang *et al*, 1996; Sawa *et al*, 2000 e Wagner & Meyerowitz, 2002). As diferenças na composição destes complexos, estão relacionadas com sua função, uma vez que, ensaios utilizando redes de nucleossomos sugerem que os diferentes promotores não são dependentes dos mesmos complexos remodeladores (revisado em Muchardt & Yaniv, 2001).

Os complexos SWI/SNF de humanos foram implicados, *in vivo*, na regulação: da transcrição por receptores nucleares de hormônios (Muchardt & Yaniv, 1993; Chiba *et al*, 1994 e Singh *et al*, 1995), da ação de proteínas ligadas ao controle do ciclo celular (Trouche *et al*, 1997 e Cheng *et al*, 1999) e da expressão de algumas proteínas, como hsp70 (de la Serna *et al*, 2000), interferon- β (Agalioti *et al*, 2000), CD44 (Strobeck *et al*, 2001) e c-Fos (Murphy *et al*, 1999). Mais recentemente, tem sido relacionado à regulação transcricional do desenvolvimento, incluindo ativação de transcrição em eritrócitos (Lee *et al*, 1999 e O'Neill *et al*, 1999), mielócitos (Kowenz-Leutz & Leutz, 1999) e expressão gênica específica em músculo (de la Serna *et al*, 2001).

Tabela 1: Comparação dos componentes dos complexos relacionados a SWI/SNF em levedura, *Drosophila* e humanos (Muchardt & Yaniv, 2001).

Levedura		Drosophila	Humanos		
SWI/SNF	RSC	BAP	BAF	PBAF	N-CoR
SWI2/SNF2	Sth1	Brahma	Brm ou BRG1	BRG1	BRG1
SNF5	Sfh1	SNR1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1
SNF6					
SNF 11					
SWI1		Osa	BAF250/p270		
SWI3	RSC8	BAP155/Moira	BAF170 e BAF155	BAF170 e BAF155	BAF170 e BAF155
SWP82					
SWP73	RSC6	BAP60	BAF60a	BAF60a	
SWP29	SAS-5				
Arp7	Arp7	BAP55	β -actina	β -actina	
Arp9	Arp9	BAP47	BAF53	BAF53	
		BAP111	BAF57	BAF57	
	Rsc1, Rsc2 e Rsc4			BAF180	
					TIF β /KAP-1 HDAC3

Os complexos SWI/SNF parecem estar envolvidos tanto na repressão como na ativação da transcrição (Holstelge *et al*, 1998 e Liu *et al*, 2001). Têm importância na fase inicial da transcrição, sendo essenciais para a ação de receptores nucleares (Yoshinaga *et al*, 1992, Muchardt & Yaniv, 1993 e Chiba *et al*, 1994). Estão envolvidos também, em estágios avançados da transcrição, por sua interação com a holoenzima RNA polimerase II, em mamíferos (Wilson *et al*, 1996; Neish *et al*, 1997 e Cho *et al*, 1998). Apresentam ainda, um papel ativo na repressão transcricional, uma vez que Holstege *et al* (1998) verificaram que, em leveduras, a perda da função do domínio ATPásico de SWI2/SNF2 leva ao aumento da expressão de 203 genes (entre 5.695 genes analisados), enquanto somente 126 genes foram reprimidos. A perda parcial da função de

brahma, a homóloga de SWI2/SNF2 em *Drosophila*, leva à diferentes transformações homeóticas (Tamkun *et al*, 1992 e Elfring *et al*, 1998). Ainda em *Drosophila*, foi observado que membros do complexo SWI/SNF têm papel importante na ação de E2F, durante o desenvolvimento (Staehling-Hampton *et al*, 1999).

1.3.1. *Brm e BRG1, componentes importantes para ação do complexo SWI/SNF*

O gene *SWI2/SNF2* (*Saccharomyces cerevisiae*), homólogo do gene homeótico *brahma* de *Drosophila* (Tamkun *et al*, 1992), codifica para um componente importante do complexo SWI/SNF (Peterson & Herskowitz, 1992). Foram identificados dois homólogos destes genes, em células humanas, os quais codificam para as proteínas hBrm/hSNF2 α (Muchardt & Yaniv, 1993 e Chiba, *et al*, 1994) e hBRG1/hSNF2 β (Khavary *et al*, 1993 e Chiba *et al*, 1994). As proteínas Brm ($\approx$ 190 kDa) e BRG1 ($\approx$ 200 kDa), também apresentam o domínio conservado (cerca de 600 aminoácidos na sua região N-terminal) característico de helicases e, na região C-terminal, um domínio conservado em vários reguladores transcricionais que medeiam a interação com HAT, conhecido como bromodomínio (Dhalluin *et al*, 1999; Hudson *et al*, 2000 e Owen *et al*, 2000; revisado em Zeng & Zhou, 2002) (Figura 3B). O complexo SWI/SNF é um ativador global da transcrição de receptores nucleares, como receptores de estrógeno (Ychinose *et al*, 1997), de ácido retinóico (Chiba *et al*, 1994) e glicocorticóides (Muchardt & Yaniv, 1993), os quais se ligam a hBrm e hBRG1.

A proteína SWI2/SNF2, devido ao seu importante papel na atuação do complexo, apresenta-se altamente conservada ao longo da evolução (figura 3A), tendo sido relatados homólogos em *C. elegans* (Sawa *et al*, 2000), *Drosophila* (Tamkun *et al*, 1992), *Arabidopsis* (Wagner & Meyerowitz, 2002), camundongo (Randazzo *et al*, 1994), boi (Okabe *et al*, 1992), humanos (Muchardt & Yaniv, 1993; Khavary *et al*, 1993; Chiba *et al*, 1994) e até mesmo em bactérias (Sukhodolets & Jin, 1998).

hBrm e BRG1 podem se ligar ao produto do gene supressor de tumor Rb (retinoblastoma), numa interação proteína-proteína (Dunaief *et al*, 1994; Singh *et al*, 1995 e Strober *et al*, 1996), a qual é importante para a repressão da atividade de E2F. Esta repressão pode estar sendo modulada por atividade de HATs, as quais por sua vez, interagem com os complexos remodeladores de cromatina, como SWI/SNF (Urnov & Wolffe, 2001).

A superexpressão de hBrm, em ensaios de transfecção transitória, aumenta a eficiência de Rb na inibição da atividade de E2F1 (Trousche *et al*, 1997), induzindo a expressão de CD44 (glicoproteína transmembranar) e inibindo a expressão de ciclina A (Reisman *et al*, 2002). BRG1 e Rb, em seu estado hipofosforilado, cooperam atuando em processos como parada no crescimento e/ou diferenciação celular, mostrando que *BRG1* exibe propriedades de gene supressor de tumor (Dunaief *et al*, 1994). A interação destas proteínas com Rb, ocorre através de uma região consenso (“Rb-pocket binding motif”) (Singh *et al*, 1995 e Dunaief *et al*, 1994), que é conservada entre uma série de oncoproteínas virais que interagem com Rb e um domínio (“Rb pocket domain”) presente em Rb. Outros estudos mostraram que tanto Brm como BRG1 podem interagir com outros membros da família Rb, dependendo do heterodímero formado entre membros da família Rb e E2F (Strober *et al*, 1996).

Os componentes do complexo SWI/SNF têm sua ação regulada por fosforilação, a qual ocorre na transição G2/M do ciclo celular (Muchardt *et al*, 1996; Reyes *et al*, 1997; Sif *et al*, 1998 e Stukenberg *et al*, 1998). Sabe-se que o complexo CDK2/ciclina E, importante para regulação do ciclo celular, interage e fosforila a proteína BRG1 (Shananhan *et al*, 1999). A quinase ELK, também é capaz de fosforilar proteínas do complexo *in vitro* (Sir *et al*, 1998), inibindo sua ação.

Uma proposta para o mecanismo de regulação do ciclo celular, através da interação do complexo SWI/SNF com pRb está sumarizada na figura 4. A hipótese principal é de que o complexo atua no controle do ciclo, como um inibidor da progressão, quando ligado a pRb, devido à repressão da ação de

E2F. Quando, porém, pRb é fosforilado e se desliga do complexo, este passa a atuar como indutor da ação de E2F, por facilitar seu acesso ao DNA. Como em ensaios de co-imunoprecipitação, a proteína pRb não foi encontrada em associação com o complexo SWI/SNF (Wang *et al*, 1996) e a superexpressão de BRG1 ou Brm é capaz de induzir parada no ciclo celular, via pRb, foi proposto que para auxiliar na repressão de E2F, não seria necessária a presença do complexo SWI/SNF, sendo suficiente a interação de pRb com BRG1 ou Brm. Após fosforilação de pRb, BRG-1 ou Brm poderiam recrutar as outras proteínas, para formação do complexo SWI/SNF, auxiliando na transcrição gênica mediada por E2F.

Recentemente, porém, foram apresentadas evidências de que Rb forma um complexo repressor com HDCA (histona deacetilase) e SWI/SNF, o qual inibe a transcrição gênica de ciclinas E e A, mantendo a célula na fase G1 do ciclo. A fosforilação de Rb liberaria a HDCA do complexo e a expressão da ciclina E (Zangh *et al*, 2000). Sabe-se que a histona deacetilase HDAC-1 encontra-se ligada aos promotores que respondem à E2F, durante a fase inicial de G1, sendo liberada na transição G1-S (Ferreira *et al*, 2001).

Muchardt *et al* (1998) mostraram que a expressão de hBrm, mas não de BRG1, é inibida por fatores mitogênicos, e que a parada de crescimento em fibroblastos de camundongo leva a um acúmulo de Brm. Além disso a transformação destas células por *ras* ativado, assim como *raf* ou MT do vírus políoma, esta associada à diminuição da expressão de *brm*. A re-introdução de Brm nestas células gera uma reversão parcial do fenótipo transformado (Muchardt *et al*, 1998). A expressão de Brm também parece variar de acordo com o estágio de desenvolvimento celular. Assim, células indiferenciadas de camundongo não apresentam expressão de Brm, enquanto em embriões, sua expressão é detectada somente na fase de blastocisto (LeGouy *et al*, 1998), aumentando com o desenvolvimento do embrião, e atingindo sua expressão máxima no adulto (Reyes *et al*, 1998). Enquanto a proteína Brm tem sua concentração variada de acordo com o ciclo celular e desenvolvimento, BRG1 não apresenta variação. As duas proteínas fazem parte do complexo, sendo

mutuamente exclusivas, portanto, acredita-se que a ação do complexo apresenta diferenças quando uma ou outra destas proteínas está presente. Camundongos *brm* $-/-$ têm um desenvolvimento normal, e níveis de BRG1 aumentados, porém apresentam um aumento no peso e na proliferação de hepatócitos. Fibroblastos isolados destes camundongos apresentam problemas com o “checkpoint” da fase G1 e aumento da apoptose após indução de danos ao DNA (revisado em Muchardt & Yaniv, 1999 e 2001). Desta forma, parece que a falta de *Brm* pode ser compensada, somente em parte, pela superexpressão de BRG1.

Apesar da alta homologia entre BRG1 e *Brm* (86% similaridade e 75% identidade), seus respectivos mutantes nulos apresentam surpreendentes diferenças de fenótipo (revisto em Muchardt & Yaniv, 2001). Enquanto camundongos *BRG-1* $-/-$ não são viáveis, camundongos *brm* $-/-$, são viáveis, apresentando aumento de peso, proliferação anormal de fibroblastos e hepatócitos. Os diferentes complexos SWI/SNF de mamífero (tabela 1), apresentam variação em seus componentes, além da composição de *Brm* e *BRG-1*, o que mostra que a especificidade destes complexos pode ser correlacionada com sua composição. Podendo ser citado, que no complexo em pBAF somente *BRG-1* está presente e no complexo BAF tanto *Brm* como *BRG1* podem estar presentes (revisto em Muchardt & Yaniv, 2001).

1.3.2. Envolvimento do complexo SWI/SNF em câncer

Os complexos SWI/SNF de humanos interagem com muitas proteínas celulares relacionadas ao ciclo celular como pRb (Dunaief *et al*, 1994; Strober *et al*, 1996 e Trouche *et al*, 1997), c-Myc (Cheng *et al*, 1999), heterodímero cFos/cJun (Ito *et al*, 2001), ciclina E (Shanahan *et al*, 1999) e proteínas virais; EBNA2 de EBV (Wu *et al*, 1996); E1 de HPV (Lee *et al*, 1999). Desta forma, anormalidades do complexo ou perda da função do mesmo podem estar associadas a tumorigênese, por uma desregulação da maquinaria regulatória do ciclo celular ou por interferir na expressão normal de genes que regulam o mesmo.

A proteína supressora de tumor BRCA1 foi, também, encontrada em associação com uma versão do complexo BAF (SWI/SNF de mamíferos) (Bochar *et al*, 2000), esta proteína está mutada em 50% dos cânceres de mama hereditários e em 90% de cânceres de mama e ovário. A expressão aberrante da glicoproteína transmembranar CD44 está relacionada com o crescimento e metástase de vários tumores. A expressão normal de CD44 é regulada por BRG1 (Strobeck *et al*, 2000) e Brm (Reisman *et al*, 2002), mostrando uma relação destes dois componentes do complexo SWI/SNF com a regulação da adesão celular e metástase.

A superexpressão de BRG1 em células normais induz a parada de crescimento e senescência celular, sua associação com a Ciclina E suprime este fenômeno (Shanahan *et al*, 1999). A superexpressão de ciclina E em muitos tumores humanos pode ser o mecanismo pelo qual, células malignas escapam da parada no ciclo celular e senescência.

O gene que codifica para BAF46 (um componente de SWI/SNF de mamíferos), está mapeado na região 22q11.2, a qual está freqüentemente alterada em diversos tipos de tumores. Uma série de estudos tem mostrado mutações pontuais neste gene em tumores primários e em linhagens celulares tumorais, em leucemia mielóide crônica, assim como em tumores do sistema

nervoso central (Rosty *et al*, 1998; Versteeg *et al*, 1998; Biegel *et al*, 1999; DeCristofaro *et al*, 1999; Grand *et al*, 1999 e Sevenet *et al*, 1999).

DeCristofaro *et al* (2001) descrevem uma linhagem de carcinoma pancreático negativa para BRG1 e hBrm. Wong *et al* (2000) identificaram pelo menos 12 linhagens tumorais humanas que carregam mutações do gene BRG1 em ambos alelos. A maioria destas linhagens perdeu a expressão de BRG1 inteiramente. Reisman *et al* (2002) identificaram 6 linhagens tumorais humanas que apresentam diminuição na expressão de BRG1 e Brm. Muitas linhagens celulares de camundongo perdem a expressão de Brm após transformação (LeGouy *et al*, 1998 e Muchardt *et al*, 1998).

Células que não possuem níveis detectáveis, da proteína BRG1 ou Brm, são resistentes à parada no ciclo, mesmo com a expressão constitutiva de pRb hipofosforilado, o que é suprimido pela re-introdução de BRG-1 (Strobeck *et al*, 2000). Ensaios de superexpressão de Rb em células tumorais, sugerem que o complexo SWI/SNF é necessário para a expressão ordenada de Ciclina E e de Ciclina A durante a fase tardia de G1 e S (Zhang *et al*, 2000). A proteína p16ink4a, inibe a ação de CDK4/ciclina D, auxiliando pRb na regulação de E2F. Esta via é alterada em uma grande parte de tumores humanos, porém em alguns tumores, apesar de ocorrer alteração na ação de pRb, não são encontradas alterações na via p16ink4a/CDK4/ciclinaD. Desta forma, os problemas na ação de pRb nestes tumores, poderiam ser explicados por alteração da interação de pRb com outras proteínas regulatórias, conforme mostrado em Strobeck *et al* (2000).

A maioria dos pacientes com síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), uma desordem autossômica caracterizada por pólipos no trato intestinal e aumento de 18x no risco de desenvolver câncer, apresenta uma inativação da serina-treonina quinase LKB1 (STK11). Sabe-se que LKB1 liga-se a BRG-1, em uma associação que requer o domínio de helicase de BRG1, estimulando sua atividade ATPásica. O gene BRG-1, quando superexpresso na linhagem tumoral SW13 (que não possui BRG1 ou Brm) causa achatamento celular,

porém é necessária a presença de LKB1 ativa para que isto ocorra (Marignani et al, 2001). A inabilidade dos mutantes de LKB1 de mediar a formação de

células achatadas e a parada no ciclo celular por BRG-1, pode explicar a manifestação da Síndrome de Peutz-Jeghers.

Células de fibroblasto de rato que superexpressam a proteína quimérica SYT-SSX, resultante de uma translocação cromossômica t (X:18) ligada ao sarcoma sinovial humano, apresentam um fenótipo transformado e tumorigênico. Nesta linhagem, a proteína hBrm pode se associar com a proteína SYT-SSX e sua superexpressão suprime parte dos efeitos transformantes da proteína SYT-SSX (Nagai et al, 2001).

1.4. Hormônios Glicocorticóides e seu receptor

Os hormônios glicocorticóides (GCs) são hormônios esteróides clássicos, com atuação no controle da divisão celular, na diferenciação no desenvolvimento e homeostase. São amplamente utilizados para o tratamento de distúrbios inflamatórios e imunológicos (revisado em Epinat & Gilmore, 1999), e também para o tratamento de diversas neoplasias hematológicas e neurológicas (Coleman, 1992; Gaynon & Lusting, 1995 e Kaspers *et al*, 1996). Apesar disto as bases moleculares desta ação ainda não são completamente compreendida.

O mecanismo de ação destes hormônios envolve, principalmente, alterações nos níveis transcricionais de determinados genes (Rameh & Armelin, 1992; Riva *et al*, 1995 e Eastman-Reks & Vedecks, 1996). Os GCs inibem o crescimento de tumores como linfomas (Helmberg *et al*, 1995; Distelhorst & Dubyak, 1998) e glioblastomas (Zibera *et al*, 1992). Sabe-se que tumores da neuroglia, mais conhecidos como gliomas, estão entre os mais comuns do sistema nervoso central (Akbasak & Sunar-Akbasak, 1992).

O hormônio atravessa a membrana plasmática e se liga, no citoplasma, ao receptor de glicocorticóide (GR). Este complexo migra para o núcleo, ligando-se à seqüências específicas de DNA, chamadas GREs (elementos de

resposta a glicocorticóides) (Beato, 1989 e Yamamoto, 1985). Estas seqüências são reconhecidas por um domínio central de GR que contém dois dedos de

zinco (Luisi *et al*, 1991). GR pertence à família de receptores nucleares (revisado em Mangelsdorf *et al*, 1995 e Beato *et al*, 1995). Na ausência do hormônio, o receptor está no citoplasma, associado a um complexo multiprotéico (Rexin *et al*, 1992), o qual contém duas proteínas Hsp90 (proteína de choque térmico-90), esta ligação deixa o receptor na conformação própria para interação com seu ligante (Sanchez, 1991). Hsp90 encobre as seqüências de localização nuclear (NLSs) de GR, mantendo-o no citoplasma (Silver, 1991). A interação do hormônio com o receptor gera uma mudança conformacional, provocando o seu desligamento do complexo multiprotéico, expondo as NLSs, podendo o receptor, migrar para o núcleo e atuar com um fator de transcrição, modulando a transcrição de diversos genes responsivos a glicocorticóides (Yamamoto, 1985; Picard & Yamamoto, 1987; Picard *et al*, 1990; Silver, 1991 e Beato *et al*, 1995).

A ligação de GR aos GREs pode resultar na indução ou na repressão gênica, por transativação dependente da ligação a DNA ou via interação proteína-proteína, independente de sua ligação ao DNA (revisado em Herrlich, 2001). Inicialmente, acreditava-se que a indução ou a repressão da transcrição por GR era devida, exclusivamente, ao tipo de GRE ao qual o complexo GR-GC se ligava. Foram descritas seqüências nGRE (elementos de resposta negativa a GCs), entretanto, quando a atividade destas seqüências foi estudada, verificou-se que a resposta a GR (indução ou repressão gênica) era dependente do tipo celular (Diamond *et al*, 1990). Algumas citocinas reprimidas por GCs não apresentam seqüências nGREs em seus promotores, o que sugere um outro mecanismo para repressão da transcrição, por GR-ligante. O que explicaria porque o mesmo complexo hormônio-receptor, pode modular programas transcripcionais diferentes em diferentes células. Desta forma, supõe-se que fatores adicionais estão envolvidos na regulação hormonal da expressão gênica específica (Beato *et al*, 1987). O receptor de glicocorticóide interage com vários outros fatores de transcrição como AP-1 (revisado em Herrlich, 2001), NF-κB (Ray & Prefontaine, 1994, revisado em Herrlich, 2001), CREB (Akeerbom *et al*,

1988), podendo haver modulação da ação de GR (Miner & Yamamoto, 1991; Burns *et al*, 1994 e MacEwan *et al*, 1997).

As proteínas Brm e BRG1 podem interagir com GR, apresentando um papel importante na ativação de receptores nucleares, por sua atividade helicase (Muchardt & Yaniv, 1993 e Chiba *et al*, 1994). A ação de GR é acompanhada de alterações na estrutura da cromatina (Archer *et al*, 1991, Bresnick *et al*, 1992), sendo que estas alterações são provocadas por complexos protéicos co-ativadores transcricionais, como SWI/SNF. A ligação de GR a GRE foi capaz de estimular a desestruturação de nucleossomos, pelo complexo SWI/SNF, *in vitro* (Östlund *et al*, 1997). Para GR induzir a transcrição no promotor de MMTV (“mouse mammary tumor virus”), é necessária a presença do complexo contendo BRG1 (Fryer & Archer, 1998). A interação de GR com BAF250 (“BRG1 associated factor”), um dos componentes do complexo SWI/SNF em mamíferos, foi demonstrada por Nie *et al* (2000), *in vivo* e *in vitro*. Na figura 5, é mostrado o esquema de como se daria a modulação da transcrição gênica pela interação de GR-ligante com o complexo SWI/SNF e a maquinaria basal de transcrição. A ligação de GR-GC à seqüências GRE no DNA recruta o complexo BRG-1, o qual provoca a desestruturação dos nucleossomos, liberando o DNA para interação com a maquinaria basal da transcrição gênica.

1.5. Modelo Celular ST1 e P7

A linhagem celular C6, transformada e tumorigênica, foi isolada a partir de um glioma de rato, induzido quimicamente por metilnitrosouréia (Benda *et al*, 1968). Esta linhagem responde ao tratamento com hormônios glicocorticóides, com diminuição da proliferação e recuperação da resposta a fatores peptídicos de crescimento (Armelin *et al*, 1982; 1983; Armelin & Armelin, 1983 e Freshney, 1984).

A

B

C

Figura 5. Remodelamento da Cromatina por interação de GR com o complexo multiprotéico SWI/SNF. A: Reconhecimento de GRE pelo complexo GR-GC. B: recrutamento do complexo SWI/SNF e abertura da cromatina.; C: transcrição gênica pela maquinaria basal (modificado de Wade & Wolffe, 1999).

Foram isolados alguns variantes de C6, os quais apresentaram diferenças morfológicas e na sensibilidade ao tratamento com glicocorticóides, dentre os quais estão os variantes ST1 e P7, que são, respectivamente, hiper-responsivo e resistente ao tratamento hormonal (Armelin *et al*, 1982; 1983 e Armelin & Armelin, 1983). O variante ST1 apresenta uma resposta dramática ao tratamento com o hormônio glicocorticóide, hidrocortisona (Hy) (em concentrações fisiológicas), passando de um fenótipo transformado para normal, isto é, sua proliferação passa a ser regulada por fatores de crescimento, além de tornar-se incapaz de crescer sem adesão ao substrato ou de gerar tumor, quando injetados em animais (Armelin *et al*, 1982; 1983 e Armelin & Armelin, 1983). Este tratamento inibe, reversivelmente, a síntese de DNA, restaura a sua dependência de soro e ancoragem para o crescimento e reconstitui a composição e arquitetura celular, tanto da superfície como do citoesqueleto (Armelin *et al*, 1982, 1983 e Armelin & Armelin, 1983) levando a um impedimento da progressão através do ciclo celular, por um bloqueio específico na fase G1 (Armelin *et al*, 1983 e Mercado, 1996). Já a linhagem P7, mantém o mesmo caráter transformado e tumorigênico, tanto na ausência como na presença de hidrocortisona.

Devido a estas características, estes variantes celulares tem sido muito utilizados, como modelo em nosso laboratório, para o estudo do mecanismo de ação de hormônios glicocorticóides e das bases moleculares da reversão fenotípica apresentada por células ST1 (Valentini *et al*, 1994; Valentini & Armelin, 1996 e Armelin *et al*, 1996 e Vedoy *et al*, 2002). Hormônios glicocorticóides são quimioterápicos de uso freqüente no tratamento de glioma e glioblastomas.

A utilização de modelos celulares, que apresentam reversão fenotípica tumoral para normal, permite a análise do papel de oncogenes e de genes supressores de tumor, assim como o estudo do controle da proliferação celular normal e dos mecanismos de transdução do sinal (Noda, 1993), permitindo, também, encontrar estratégias para terapias anti-tumoral.

Os hormônios Glicocorticóides possuem uma ação importante no controle do crescimento, sendo amplamente utilizados no tratamento de linfomas e glioblastomas. Apesar de seus mecanismos moleculares de ação não estarem completamente claros, é sabido que podem atuar na inibição ou na indução do crescimento celular, dependendo do modelo estudado (Droms *et al*, 1993; Strawhecker & Pelling, 1992; Denis *et al*, 1992 e Durst *et al*, 1989).

O estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na reversão fenotípica tumoral para normal da linhagem celular ST1, induzida pelo tratamento com o hormônio glicocorticóide hidrocortisona (Hy) (Armelin *et al*, 1982; Armelin *et al*, 1983 e Armelin & Armelin, 1983), em contraste com a linhagem tumoral P7, que é resistente a este hormônio, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na ação de hormônios glicocorticóides na inibição do crescimento em tumores e nos mecanismos envolvidos no processo de transformação maligna, auxiliando no desenvolvimento de novas estratégias para a terapia anti-tumoral.

As proteínas humanas hBrm (Muchardt & Yaniv, 1993 e Chiba, *et al*, 1994) e BRG1 (Khavary *et al*, 1993 e Chiba *et al*, 1994) que interagem e regulam a ação de GR, estão envolvidas no controle do ciclo celular, e atuam como agentes anti-tumorais, em alguns casos. Devido a estas características, existe um grande interesse em estudar o papel das proteínas rBrm e rBRG1 de rato, na reversão fenotípica tumoral-normal da linhagem celular ST1.

Para tanto, os seguintes Objetivos foram propostos:

- a) Produzir e caracterizar antisoro capaz de reconhecer as proteínas BRG1 e Brm de rato;
- b) Analisar e caracterizar os níveis celulares destas duas proteínas nas linhagens ST1 e P7, na ausência e na presença de Hy;
- c) Estudar os componentes dos complexos SWI/SNF destas duas linhagens celulares
- d) Analisar o efeito da superexpressão de hBRG1 e hBrm na linhagem P7, que é resistente ao tratamento com Hy.

3.1. Plasmídeos

pET32c: vetor de expressão bacteriano, que contém o promotor forte da RNA polimerase do bacteriófago T7. O gene da T7 RNA polimerase, no hospedeiro, deve estar sob o controle do promotor lacUV5, sendo a expressão induzida por IPTG (isopropil β -D-thiogalactopiranosídeo). Este vetor possui ainda, a sequência His•Tag®, a qual facilita a purificação e detecção imunológica da proteína expressa. Além disso, a proteína é expressa em fusão com a tiorredoxina, a qual proporciona o aumento da solubilidade no citoplasma de *E. coli* (pET, Novagen, Inc.).

pET-hbrg: construção feita por Fernanda Ortis e colaboradores, em nosso laboratório (não publicado) para expressão da proteína recombinante de Trx fusionada com um fragmento da proteína humana hBRG1 (fragmento de 3317 a 4849 pb).

pSVKS: vetor de expressão para mamíferos, contendo o promotor e “enhancer” do vírus SV40.

pSVKS-hbrm: construção, de expressão em mamífero, contendo o cDNA completo de *hbrm*. Esta construção foi cedida pelo Dr. Hiroyuki Kato do Instituto de Ciências Médicas da Universidade de Tokyo, Japão (Chiba *et al*, 1994).

pSVKS-hBRG1: construção, de expressão em mamífero, contendo o cDNA completo de *hBRG1*. Esta construção foi cedida pelo Dr. Hiroyuki Kato do Instituto de Ciências Médicas da Universidade de Tokyo, Japão (Chiba *et al*, 1994).

pX343: vetor de expressão em mamífero, construído a partir de pBR322, que contém o gene bacteriano que confere resistência a higromicina B, sob o controle do LTR de Mo-MuSV.

pUC18: vetor de clonagem em *E. coli*, que possui o gene que confere resistência a ampicilina. Expressa a α -peptídeo da β -galactosidase, e a inserção de um fragmento de DNA em seu sítio múltiplo de clonagem, resulta na

interrupção da expressão deste peptídeo, facilitando a seleção de clones recombinante.

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

3.2. Linhagens celulares

ST1: clone derivado de células C6 de glioma de rato (Benda *et al*, 1968), hipersensível ao tratamento com hidrocortisona, sendo transformado e tumorigênico (Armelin *et al*, 1982; Armelin & Armelin, 1983; Armelin *et al*, 1983).

P7: clone derivado de células C6 de glioma de rato, resistente ao tratamento na presença dehidrocortisona, transformado e tumorigênico (Armelin *et al*, 1982; Armelin & Armelin, 1983; Armelin *et al*, 1983).

A31: clone celular obtido a partir de células Balbc-3T3, célula mesenquimal de embrião de camundongo Balb-c (Aaronson & Todaro, 1968) cedido pelo laboratório do Dr. Charles Stiles, Dana Faber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

B61: clone derivado de células A31, através de transfecção com o oncogene *EJ-ras* humano (H-ras mutado) (Kovary *et al*, 1989), que é transformada e tumorigênica.

MTWT: A31 infectada com o vetor retroviral PLJ-MTWT, que expressa a proteína MT selvagem do vírus polioma.

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

REF: fibroblastos embrionário de rato. Cultura primária de embrião de rato, gerada em nosso laboratório pela Dra Mari Sogayar.

3.3. Cultura de células

3.3.1. Manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas em frascos plásticos descartáveis, contendo meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco-Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA), suplementado com 1,2g/l de bicarbonato de sódio, 25 mg/L de ampicilina e 100 mg/l de estreptomicina, com 5 ou 10 % de SFB (soro bovino fetal-Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo). O pH e a temperatura são mantidos em faixa fisiológica através de incubação em estufa a 37°C, na presença de atmosfera de 2% CO₂. Estoques destas linhagens são mantidos congelados em nitrogênio líquido, em 5% ou 10% SBF-DMEM e 10% DMSO (dimetilsulfóxido). O meio de cultura é renovado a cada três dias e a cultura é sub-dividida quando as células atingem uma densidade equivalente a 80% da densidade de saturação.

3.3.2. Reagentes utilizados

- Higromicina B: Sigma, St. Louis, USA.
- Hidrocortisona: Sigma, St. Louis, USA.
- Tripsina: ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland USA; Gibco Limited, Scotland, UK.

3.4. Cepas bacterianas utilizadas

DH5 α - cepa de *E. coli* utilizada para clonagem gênica (Hanahan, 1983).

JM109 – cepa utilizada na clonagem gênica (Yanisch-Perron *et al*, 1985). A cepa DE3 contém o plasmídeo de expressão da proteína T7 RNA polimerase, induzida por IPTG.

BL21 – cepa utilizada na clonagem gênica e armazenamento das construções. A cepa DE3 contém o plasmídeo de expressão da proteína T7 RNA polimerase, induzida por IPTG.

XL1-Blue - cepa de *E. coli* utilizada para clonagem gênica (Bullock *et al*, 1987)

3.5. Preparo de bactérias competentes para transformação com DNA plasmideal

3.5.1. Pelo Método de CaCl_2 (Sambrook et al, 1989)

Bactérias *Escherichia coli* (linhagens descritas em 3.4.) foram crescidas em meio LB até atingirem a fase exponencial de crescimento, ou seja, uma Absorbância (A) a 600nm de 0,5 ($\text{OD}_{600}=0,5$). A suspensão bacteriana foi centrifugada a 1.464xg, a 4°C, por 15 min e incubadas com solução de cloreto de cálcio 0,1M. Após incubação por 20 min em gelo, as bactérias foram centrifugadas a 1464xg, a 4°C, por 15 min e incubadas por 1h, em gelo, na presença de solução de cloreto de cálcio 0,1M. Após este período as bactérias competentes foram utilizadas para transformação ou congeladas a -70°C, em glicerol (concentração final 10%).

Para transformação, estas bactérias foram misturadas ao DNA plasmideal (0,1-0,5µg) e incubadas, primeiro, em gelo durante 20-30 min e depois, a 37°C durante 5 min. Após adição de meio LB, foram novamente incubadas a 37°C, por 60 min. Uma alíquota desta suspensão foi semeada em placas de LB-agar-ampicilina (80µg/µL).

3.5.2. Pelo método de Eletroporação.

Bactérias *Escherichia coli* foram cultivadas em meio LB até atingir uma $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ de 0,5 a 0,8, incubadas em gelo durante 30 min e centrifugadas a 4.000xg, a 4°C, por 15 min. O sedimento foi ressuspenso com água MilliQ gelada, e novamente centrifugado (4.000xg por 15 min) num total de 5 vezes, para remoção do excesso de sal. O sedimento foi ressuspenso em solução de 10% glicerol, centrifugado como anteriormente e o sedimento final foi ressuspenso novamente em solução de 10% glicerol. Desta forma, estas bactérias ficaram eletrocompetentes podendo ser congeladas a -70°C.

Para a transformação, as bactérias eletrocompetentes foram colocadas dentro de cubetas de eletroporação, previamente resfriadas em gelo, juntamente com 2 a 10ng de DNA e submetidas a um pulso elétrico, com uma tensão de 1,8 kV. Imediatamente após, foi adicionado 1ml de meio LB. Com

1h de incubação a 37°C sob agitação, as bactérias foram plaqueadas em placas contendo LB-Agar e LB-Agar-Ampicilina (80µg/ml) e incubadas a 37°C por aproximadamente 16h.

3.6. Preparo de DNA plasmideal em média escala

3.6.1. Purificação plasmideal por Lise Alcalina (Ausubel et al, 2002)

As bactérias foram inoculadas em 50ml de meio LB-ampicilina (80µg/µL) por 16h, a 37°C, com agitação. Após centrifugação (5.220xg, 5 min a 4°C) o sedimento bacteriano foi ressuspenso em 2ml de tampão GET contendo 2mg de lisozima e 20µg de RNase e deixado à temperatura ambiente por 2 min. Após a adição de 4ml de solução de lise alcalina, a suspensão foi incubada em gelo por 5 min. A suspensão foi incubada por mais 5 min em gelo, após a adição de 3ml de KAc 5M gelado. O lisado foi centrifugado por 10 min, a 16.000xg, a 4°C. Ao sobrenadante, foi adicionado 1 volume de isopropanol para a precipitação do DNA plasmideal, e a suspensão foi incubada à temperatura ambiente por 15 min. O DNA foi centrifugado a 2.940xg, por 15 min, à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado 2 vezes com etanol 70% e ressuspenso em 0,5ml de tampão TE (pH 8,0).

Para retirar as impurezas protéicas, o DNA foi extraído 1 vez com 1 volume de solução fenol-clorofórmio e 1 vez com 1 volume de clorofórmio. Para precipitação do DNA plasmideal, à fase aquosa foi adicionado 0,1 volume de NaAc 2M pH 6,5 e 2 volumes de etanol absoluto e a suspensão foi incubada 16h a -20°C. A suspensão foi centrifugada a 8.160xg, por 30 min, à temperatura ambiente e o sedimento foi dissolvido em 250µL de TE, após secagem à temperatura ambiente.

3.6.2. Preparação plasmideal utilizando kits Comerciais.

O DNA plasmideal foi obtido, também, utilizando-se kits de purificação comerciais como QIAfilter Plasmid Mid Kit (Qiagen Inc); InConcert™ Nucleic Acid Purification System (Invitrogen) ou S.N.A.P. MidiPrep kit (Invitrogen). Os protocolos utilizados nestes casos são aqueles descritos nas instruções do fabricante.

Para avaliação da concentração obtida de DNA e de sua eventual contaminação por proteína, foi feita uma leitura da absorbância de uma amostra do DNA, a 260 e a 280 nm. Este DNA foi analisado, também, através de digestão com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel 1% agarose em 0,5X TAE contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo.

3.7. Subclonagem dos cDNAs de *hbrm* e *hBRG1* em vetor de expressão bacteriana ou em vetor de clonagem (Sambrook *et al*, 1989 e Ausubel *et al*, 2002).

3.7.1. Preparo de vetor e inserto para subclonagem

3.7.1.1. Obtenção de inserto por digestão de fragmento do cDNA (Sambrook *et al*, 1989)

O DNA do vetor (que contém o cDNA do gene *hBRG1*) foi digerido com enzimas de restrição (*HindIII* e *EcoRI*) em condições adequadas para liberação do inserto correspondente ao gene de interesse. O inserto foi fracionado em gel de agarose e a banda de interesse foi extraída utilizando-se o kit de extração de bandas de DNA de gel (QIAEX Gel Extraction QIAGEN Inc. ou Sephaglas™ BandPrep ou GFX™PCR DNA - Amersham Pharmacia Biotech). O inserto foi purificado através de uma coluna MicroSpin™ S-200 HR (Pharmacia Biotech®) e quantificado tanto visualmente, em gel de agarose, quanto por leitura da absorbância em espectrofotômetro. Em alguns casos, foi feita uma reação de RT-PCR, como descrito em 3.12., utilizando-se iniciadores com seqüências específicas, para obtenção do inserto.

3.7.1.2. Obtenção do vetor

O vetor (pET32c ou pUC18) também foi digerido com enzimas de restrição compatíveis as extremidades do inserto e desfosforilado pela adição de 2 U de CIAP, por 25 minutos, a 37°C e a enzima foi desativada por incubação a 75°C 15 minutos. Os vetores foram purificados como descrito em 3.7.1.1.

3.7.2. Reação de Ligação de inserto e vetor

A ligação foi realizada com cerca de 100 a 150ng de DNA total, com a proporção molar inserto:vetor de 3:1. Utilizando-se a T4 DNA ligase Ready-to-

Go (Amersham Pharmacia Biotech), a qual já vem com o tampão adequado ou T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech) mais tampão adequado, contendo ATP. A reação foi incubada por 16h, a 16°C ou temperatura ambiente durante 2 dias. Em paralelo, foi feito um controle para a desfosforilação do vetor, onde somente o vetor desfosforilado foi incubado com ligase e tampão, nas mesmas condições das outras reações. A transformação bacteriana, com o produto desta ligação, foi feita como descrito em 3.6.

3.7.3. Identificação dos clones recombinantes positivos.

3.7.3.1. Método rápido com fenol clorofórmio (Beuken et al, 1998)

Esta técnica baseia-se na diferença de migração de plasmídeos com tamanhos diferentes, em gel de agarose, mesmo não estando linearizados. Fazendo-se uma preparação plasmídeal rápida, poderíamos analisar a presença de vetores recombinantes por uma diferença de migração destes, em gel de agarose, quando comparado ao mesmo vetor vazio. Uma alíquota de cultura bacteriana (150µl), crescida por 16h, foi centrifugada (15-20 s, vel max) e ao sedimento foi adicionado 14µl de fenol-clorofórmio (1:1) e 10µl de 5X tampão de amostra para DNA. A mistura foi agitada e centrifugada por 5 min a velocidade máxima. A fase aquosa (10µl) foi fracionada em gel de agarose. Uma preparação de vetor vazio (sem inserto), foi submetida ao mesmo tratamento, para comparação.

3.7.3.2. PCR de colônia

Os clones resistentes ao marcador seletivo, presente no vetor de interesse (que crescem nas placas contendo antibiótico específico) são crescidos em placas de 96 poços, em meio LB mais antibiótico específico, por aproximadamente 16h. Uma amostra de cada uma destas colônias é transferida para uma outra placa de 96 poços, com ajuda do replicador de Bökel, a qual contém 10µl de Mix, para reação de PCR. Após termociclagem (95°C por 1 min; 40 ciclos de 95°C por 45 seg; 55°C por 45 seg e 72°C por 1 min), são adicionados 2,5µl de tampão de amostra para DNA, e 5µl de cada amostra são fracionados em gel de agarose.

3.7.3.3. *Preparo do DNA em pequena escala (“mini-prep”) e digestão com enzimas de restrição específicas. (Ausubel et al, 2002)*

As colônias de bactérias que cresceram na placa contendo ampicilina foram inoculadas, separadamente, em 3ml de meio LB (80µg/ml de ampicilina) e incubadas 16h a 37°C, com agitação. A suspensão bacteriana (1,5ml) foi centrifugada a 12.000xg por 1 min e ressuspensas em 100µl de tampão GET. As bactérias foram lisadas por adição de 200µl da solução alcalina de lise. Após adição de 150µl de solução de acetato de potássio 3M o lisado foi centrifugado (12.000xg por 5 min, a 4°C) e o sobrenadante coletado. O DNA plasmideal foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e centrifugação (12.000xg, por 5 minutos, a 4°C). O sedimento foi lavado com etanol 70% e após secagem, a temperatura ambiente, o DNA foi dissolvido em tampão TE. Também foram utilizados kits comerciais de purificação de DNA plasmideal (Qiagen Inc., InConcert™ Nuclei Acid Purification System-Life Technologies; Wizard Plus Miniprep DNA purification System, Promega). Para analisar um maior número de colônias, foram feitas mini preparações de DNA, em placas de 96 poços, conforme Ausubel *et al*, 2002.

Para avaliar se a ligação havia ocorrido foram feitas digestões, com enzimas de restrição apropriadas, e o tamanho do plasmídeo ou a liberação de um inserto de tamanho compatível com o esperado, foi analisado por gel de agarose 1% TBE, contendo brometo de etídio (0,01% v/v).

3.8. Seqüenciamento de fragmentos do cDNA do gene *brm*.

3.8.1. *RT-PCR para isolamento de fragmentos do cDNA de *brm* das células ST1 e P7 e REF.*

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi feita a reação de RT-PCR, utilizando-se a enzima SUPERScript™II (Life Technologies), descrita abaixo. Foram misturados 1µl de Oligo(dT) (500µg/ml), com 200ng do RNA total (obtido como descrito em 2.12.) e 1µl 10mM dNTP Mix (10mM de cada um dos quatro dNTPs em tampão neutro), em 12µl de volume final. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 min e resfriada em gelo. Foram, então, adicionados: 4µl 10X

First-Strand Buffer; 2µl de 0,1M DTT e 1µl de RNaseOUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor) (40 U/µl). A reação foi incubada a 42°C por 2 min, e em seguida, foi adicionado 1µl (200 U) de SUPERSRIPT II e, após 50 min a 42°C a enzima foi inativada por aquecimento (70°C por 15 min). Esta reação foi diluída (1/50) e 1µl foi utilizado na reação de PCR (abaixo), usando iniciadores com seqüências específicas, descritos em 3.8.3.

Componentes	Concentração Final
10X High Fidelity PCR Buffer	1X
dNTP mix	0,2 mM
MgSO ₄	2 mM
Mix de Iniciadores	0,2 µM
DNA molde	1/100*
PLATINIUM Taq High Fidelity*	2,5 U

* obtido de uma mini prep

Após desnaturação inicial de 95°C por 3 min a termociclagem foi feita em 40 ciclos, nas seguintes condições:

95°C	1 min
**	1 min
68°C	3-6 min

** As temperaturas de anelamento utilizadas variaram de acordo com o iniciador utilizado, tendo uma variação de 50-62°C.

Os fragmentos amplificados foram subclonados em vetor pUC18, conforme descrito em 2.7.

3.8.2. Reações de sequenciamento

O DNA foi preparado de acordo com o item 3.6. O sequenciamento foi realizado pelo método do dideoxi-nucleotídeos (Sanger *et al*, 1977 e Tabor & Richardson, 1987), utilizando o kit ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems, Perkin-Elmer). Para a reação de sequenciamento foram utilizados 500ng de DNA, 2µM do oligonucleotídeo iniciador, 8µl da mistura de terminação (contendo ddNTPs marcados com fluorescência diferente para cada base; TrisCl pH 9,0; MgCl₂; pirofosfatase e AmpliTaq DNA polimerase) e água para completar num total de 20µl.

O DNA foi inicialmente desnaturado a 95°C por 2 min e a reação foi feita em 40 ciclos, em termociclador automático, nas seguintes condições:

95°C	1 min
55°C	0,5 min
68°C	4 min

O DNA da reação foi precipitado adicionando-se 2µl de uma solução de Acetato de sódio 1,5M, pH 8,0/250mM EDTA, etanol na concentração final de 75%. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco ao ar e ressuspenso em “loading Dye”. A amostra foi fracionada em gel e analisada pelo ABI Prism 377 DNA Sequencer.

3.8.2.1. Iniciadores para seqüenciamento.

Para vetores pET

pET-S-Tag (senso): 3' CGAACGCCAGCACATGGACA 5'

pET-T7 (antisenso): 3' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 5'

Para vetores pUC18

Iniciadores senso e antisenso M13 (Sambrook *et al*, 1989)

3.8.2.2. Iniciadores para amplificação dos fragmentos do cDNA correspondente ao gene *rbrm*.

Fragmento de 1,5 a 3,0 kbp do cDNA de hbrm

r153F (senso): 3' GCTGTTGAGGTACTCCTGGTGCT 5'

r153R (antisenso): 3'GTAGGGAGGAGGAAGTTGAGGA 5'

Fragmento de 3,0 a 4,5 kbp do cDNA de hbrm

r345F (senso): 3' TTTAATGCTCCGTTTGCCATGA 5'

r345R (antisenso): 3' CTGTCGCCCTGAACTGTTTCCT 5'

Fragmento de 4,0 a 5,5 kbp do cDNA de hbrm

r455F: (senso): 3' CGTGAAGGAAGATGTGGAAAA 5'

r455R: (antisenso): 3' CCATACACATCGGGTAACACAGG 5'

3.9. Produção de anti-soro policlonal contra as proteínas Brm e BRG1

3.9.1. Produção e caracterização de proteínas Tireodoxina (Trx) e Trx-Brg, expressas em bactérias (conforme, *pET System Manual*, 1995).

3.9.1.1. Rastreamento de clones positivos para expressão da proteína de fusão Trx-Brg.

Um pré-inoculo, crescido 16h em meio LB contendo 80µg/ml de ampicilina, de bactérias (BL21 DE3 ou JM109 DE3) transformadas com a construção *pET-hbrg* ou pET, foi diluído 1/10 em 20ml do mesmo meio e a cultura foi crescida até atingir OD_{600nm} 0,4-0,6. Neste momento foi adicionado IPTG (concentração final 0,1 mM) para a indução da expressão das proteínas recombinantes (4 h). As bactérias foram coletadas por centrifugação (6.000xg por 10 min) e, ao sedimento foi adicionado 1 volume de tampão de amostra para proteína (2X). Estas amostras foram fervidas por 5 min e fracionadas em gel 10% poliacrilamida, descrito em 3.9.. A expressão da proteína de interesse foi confirmada por análise dos géis ou por Western blot, como descrito em 3.9., utilizando-se anti-His (Amershan-Pharmacia Biotech).

3.9.1.2. Produção das proteínas de fusão Trx e Trx-Brg em média escala

Um pré-inoculo, crescido “overnight” em meio LB contendo 80µg/ml de ampicilina, de bactérias (BL21 DE3 ou JM109 DE3) transformadas com a construção *pET-hbrg* ou pET, foi diluído 1/10 em 500ml do mesmo meio e a cultura foi crescida até atingir OD_{600nm} 0,4-0,6. Neste momento foi adicionado IPTG (concentração final 0,1 mM) para a indução da expressão das proteínas recombinantes (4 h). As bactérias foram coletadas por centrifugação (6.000xg por 10 min) e ao sedimento, foi adicionado 25ml do tampão de ligação para sistema pET (contendo inibidores de protease como aprotinina e PMSF). As bactérias foram lisadas por sonicação e novamente centrifugadas a 6.000xg por 10 min. O sobrenadante foi incubado com His•Bind (resina quelante de metal, Novagen Inc), previamente tratada para a ligação a proteína (Ni⁺² imobilizado) e misturado gentilmente, a temperatura ambiente, por 1 h. Após centrifugação a 500g, por 5 min, a proteína de fusão ligada a resina, foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem para o sistema pET. A proteína foi eluida incubando-a com

tampão de eluição para o sistema pET, durante 15 minutos. Após centrifugação, 500xg, por 5 min, o sobrenadante, contendo a proteína foi armazenado a -20°C. A eluição foi repetida por mais 3 vezes. A concentração da proteína purificada obtida foi feita pelo kit da Bio-Rad Protein Assay, método de Bradford, 1976.

3.9.1.3.. Análise da purificação da proteína recombinante Trx-Brg em gel de SDS-poliacrilamida, conforme Sambrook et al, 1989.

Uma amostra de cada etapa foi misturada com tampão de amostra para proteína (2X concentrado). Foram retiradas amostras de bactérias induzidas e não induzidas à produção protéica e a estas também foi adicionado tampão de amostra (2X concentrado). As amostras foram fervidas por 5 min e analisadas em gel 10% SDS-poliacrilamida. Como controle da massa molecular foram utilizados marcadores “pre-stained” (GIBCO BRL® ou Bio Rad). O gel foi corado, após a corrida, com Coomassie Blue, descorado com solução de ácido acético 7% e seco em papel celofane.

3.9.2. Obtenção de anti-soro policlonal contra a proteína Trx-Brg em coelhos.

3.9.2.1. Coleta e processamento do sangue de coelho para obtenção de anti-soro (Harlow & Lane, 1988 e Sambrook et al, 1989).

Um volume de 5-20ml de sangue do animal (coelha fêmea da raça neozelandesa, com aproximadamente 3 meses de idade) foi retirado de um vaso sanguíneo localizado na orelha. Coletado em um tubo contendo um palito de madeira, incubado a 37°C durante 1 hora e deixado a 4°C 5-12 h. O soro ao redor do coágulo (retraído no palito) foi reservado e o coágulo centrifugado a 1.500xg, a 4°C, por 10 min, para obtenção de soro residual. Para clarificação do soro, ambas frações deste foram centrifugadas a 10.000xg, 4°C, por 10 min. O soro foi aliquotado e estocado a -70°C. Este procedimento foi feito para obtenção, tanto de soro pré-imune como imune.

3.9.2.2. *Preparo da mistura para inoculação em coelhos (Harlow & Lane, 1988; Sambrook et al, 1989).*

A solução de adjuvante de Freund, 500µl, foi misturada a 500µl da solução contendo 200µg da proteína de fusão Trx-Brg em PBSA. Esta mistura foi emulsionada por múltiplas passagens por agulha 22G, sendo injetada logo após emulsificação.

3.9.2.3. *Imunização inicial e inoculações de reforço (Sambrook et al, 1989; Zola, 1990).*

Na imunização inicial foi inoculado 1,0ml da suspensão proteína-adjuvante, preparada conforme item 3.9.2.2., no animal da seguinte forma:

-0,4ml na musculatura da perna

-0,6ml por via intradérmica em 4 sítios no dorso do animal

A inoculação de reforço foi feita por injeção na musculatura da perna.

3.10. **Ensaio de Western blot (Harlow & Lane, 1988, Sambrook et al, 1989 e Ausubel et al, 1998).**

3.10.1. *Obtenção de extratos de protéicos celulares*

3.10.1.1. *Extrato total protéico de culturas celulares*

As células foram plaqueadas em placas de 100 mm de diâmetro (P100). Após atingirem a subconfluência, o meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas com PBS, a 4°C. O tampão Ripa mais foi adicionado, para a lise celular. Após 15 min no gelo e passagem por seringa com agulha de 22G, o lisado foi centrifugado a 10.000xg, durante 10 min, a 4°C, para retirada de “debris” celulares. A concentração de proteínas foi determinada pelo uso do kit da Bio-Rad (método de Bradford, 1976) utilizando-se uma curva padrão com BSA (albumina sérica bovina).

3.10.1.2. *Extrato nuclear e citoplasmático*

As células foram lavadas 2 X com PBSA gelado, raspadas com o auxílio de um policial, transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 234xg por 5

min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 400µl de tampão hipotônico e deixado no gelo por 10 min. As células foram lisadas por adição de Nonidet P-40 (0,1%) e agitação em vortex por 30 seg. A suspensão foi centrifugada a 16.000xg por 30 seg. O sobrenadante, contendo a fração citoplasmática foi guardado. O sedimento contendo os núcleos foi cuidadosamente lavado com tampão hipotônico. Os núcleos foram ressuspenso em 100µl de tampão de extração nuclear, e incubados por 30 min, em gelo. A suspensão de núcleos foi centrifugada a 16.000xg por 30 min, a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas nucleares, foi armazenado a -70°C.

3.10.2. Fracionamento de proteínas em SDS-PAGE e transferência para membrana de nitrocelulose.

Para o fracionamento das proteínas obtidas no extrato protéico celular, alíquotas de igual concentração protéica foram misturadas ao tampão de amostra (2X concentrados) e aplicadas em gel 6, 10 e 12% SDS-poliacrilamida, para as proteínas obtidas de bactérias recombinantes o preparo foi igual ao descrito no item 3.9.1.1. Após a corrida os géis foram colocados em tampão de transferência e as proteínas, no gel, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, via semi-seca ou úmida.

A membrana foi corada com corante Ponceau para localização das proteínas transferidas e, em seguida, descorada com água destilada. O gel foi corado com Coomassie Blue para monitorar a eficiência da transferência.

3.10.3. Imunoreação e revelação

A membrana foi incubada com tampão de bloqueio por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

O tampão de bloqueio foi substituído pelo anti-soro específico, diluído em TBST. A membrana foi incubada, à temperatura ambiente sob agitação, após, aproximadamente 5 horas de incubação, a membrana foi lavada 4 vezes com TBST, por 10 minutos e incubada com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:15.000 em tampão de

bloqueio) durante 2 hs. A membrana foi lavada 4 vezes com TBS por 10 minutos.

Para visualização da reação foi utilizado o Kit da Amersham (ECL Western Blotting Detection Reagentes) ou o kit Vista Fluorescence Western blotting (Molecular Dynamics). No primeiro caso, após o tratamento, as membranas foram expostas a filme de raio-X e reveladas e no segundo a quantificação dos resultados foi feita com o auxílio do programa ImageQuant.

3.11. Imunoprecipitação de proteínas celulares (segundo Kovary & Bravo, 1991; Bonifacino *et al*, 2000 e Harlow & Lane, 1988) e otimização da técnica para o anti-soro anti-BRG.

3.11.1. Marcação metabólica e estímulo celular

3.11.1.1. Para células A31, B61 e HeLa

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo meio DMEM-10% SBF. Após dois dias, foram carenciadas para soro (0,5% SBF) durante 48 hs. O meio foi retirado e os poços lavados com PBS 2 vezes, as células foram incubadas por 30 min com meio 0,5% SBF dializado-DMEM sem metionina. Este meio foi substituído por meio DMEM 0,5%, ou 10% SBF dialisado, contendo 400 μ Ci/ml de metionina radioativa (S^{35}). As células foram incubadas em atmosfera de CO₂, a 37°C, por 5 hs, para marcação das proteínas com metionina radioativa.

3.11.1.2. Para células ST1 e P7

O plaqueamento foi feito conforme descrito em 3.11.1.1. em meio DMEM-5% SBF. Quando antigiram a subconfluência foram tratadas com Hy por diferentes tempos. Para marcação, o meio foi retirado e as células incubadas por 30 min, com meio DMEM 5% SBF dialisado, sem metionina. Este meio foi substituído por DMEM 5% SBF dialisado, contendo 400 μ Ci/ml de metionina radioativa (S^{35}). As células foram incubadas em atmosfera de 2,5% CO₂, a 37°C por 5 hs, para marcação das proteínas com metionina radioativa.

3.11.2. Preparo do lisado celular

3.11.2.1. Lise desnaturante

O meio de cultura foi retirado e os poços lavados 2 vezes com PBS gelado. As células foram ressuspensas em 200µl de tampão de lise, e o lisado fervido durante 10 min. Foi adicionado 800µl de tampão Ripa menos, e os lisados foram centrifugados por 30 min a 16.000xg, a 4°C, para clarificação. Uma amostra de 2µl de cada lisado foi utilizada para contagem, por cintilação, da metionina radioativa incorporada às proteínas, para normalização dos lisados.

3.11.2.2. Lise não desnaturante

O meio de cultura foi retirado e os poços lavados 2 vezes com PBS gelado. As células foram ressuspensas em 1,0ml de tampão Ripa – (mais inibidores de protease) e vortexadas por 3 seg. O lisado foi incubado no gelo por 15 a 30 min e centrifugado por 15 min a 16.000xg, 4°C, para clarificação. Uma amostra de 2µl de cada lisado também foi utilizada para contagem da metionina radioativa incorporada, como descrito anteriormente.

3.11.3. Imunoreação

Todos os lisados foram pré-incubados com as "beads" de proteína A-agarose 50% (30µl) durante 1 h, para diminuir reações inespecíficas. O sobrenadante foi utilizado em dois diferentes protocolos, para avaliar qual seria o mais adequado para o anti-soro em questão: 1º: os anti-soros foram pré-incubados com 30µl de "beads" (uma suspensão, 50%, de proteína A-agarose em 100 mM Tris-HCl, pH 7,5), durante 1 h, a 4°C, sob agitação e em seguida, este anti-soro, ligado as "beads" foi incubado com o lisado celular "overnight" a 4°C; 2º: os lisados foram primeiramente incubados com o anti-soro, "overnight" a 4°C, e, em seguida, com as "beads" (30µl) durante 1 h. Após a incubação a 4°C os lisados foram centrifugados a 14.000xg por 10 seg e o sobrenadante foi descartado. As "beads" foram lavadas 2 vezes com o tampão A e depois B e uma vez com o tampão C. Às "beads" finais foram adicionados 15µl de tampão

de amostra e as mesmas foram fervidas durante 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi aplicado em um gel de SDS-poliacrilamida 12%.

3.11.4. Fixação, amplificação, secagem e revelação do gel

Após fixação do gel com solução 10% metanol e 7% ácido acético, durante 30 min, sob agitação, o mesmo foi incubado com a solução de fluorografia (Amplify -Amersham) por 30 min. Após secagem a vácuo, a 80°C, por 2 hs, o gel foi exposto a filme de raio X por 29 dias.

3.12. Obtenção de RNA de células de mamífero

2.12.1. RNA total segundo Chirgwin et al, 1979

As células foram plaqueadas em placas de Petri de 150 mm de diâmetro e tratadas em diferentes tempos (0, 8 e 24 hs) com Hy (0,1µg/ml). Ao final do tratamento, o meio de cultura foi removido, as culturas foram lavadas com PBSA gelado e as células lisadas com solução de lise para RNA. Os lisados foram coletados com ajuda de um policial de borracha e transferidos para tubos de polialômero contendo solução de cloreto de cézio 5,7M; acetato de sódio 25mM pH 5,0 e centrifugados a 130.000xg por 17 hs, a 20°C.

O sedimento no fundo do tubo, contendo o RNA total, foi ressuspenso em água MilliQ estéril, livre de RNA, e sua concentração foi determinada pela leitura da absorbância a 260 nm e o grau de pureza determinado pela relação $Abs_{260nm}/280nm$, a qual deve estar próxima a 2.

3.12.2. Purificação de RNA mensageiro

Para purificação do RNAm foi utilizado o kit de PolyAtract® mRNA (Promega), seguindo-se o protocolo do fabricante. Uma preparação de RNA total (obtida como descrito em 3.12.1.) é misturada a uma solução de oligo(dT) biotilado. Este hibridiza-se com alta eficiência a região 3' poliA, presente na maioria dos RNAs maduros de eucariotos. Estes híbridos são lavados com alta estringência, e separados do meio por magnetismo, utilizando-se estreptavidina acoplada a partículas magnéticas. O RNAm, purificado, é eluído por adição de H₂O livre de RNAase.

3.13. Ensaios de Northern blot

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

Alíquotas de 5µg de RNAm (obtido em 3.12.2.) foram tratadas por 15 min a 65°C em presença de 18% formaldeído e 50% formamida e 1X MOPS, para impedir formação de estruturas secundárias, foram colocadas imediatamente em gelo. Após adição do tampão de amostras (o mesmo utilizado para DNA) o RNA foi fracionado por eletroforese em gel agarose-formaldeído 1%, 1X MOPS, com voltagem constante (70V). Após a corrida o gel foi lavado 4 vezes (10 min cada, em água destilada) para remoção do excesso de formaldeído, corado com brometo de etídeo e observado em luz ultravioleta. O RNA foi transferido para membrana de nylon em solução de 10X SSC, por aproximadamente 16 h. A membrana contendo as amostras de RNA fracionado, foi lavada em 3X SSC. O RNA foi fixado a 80°C por 2 h, para fixação dos RNAs.

3.13.2. *Marcação radioativa da sonda de DNA.*

Para marcação da sonda com [³²P] dCTP foi utilizado o kit Ready to Go DNA Labelling kit (Amersham Pharmacia Biotech), baseado na reação de "random-primer extension", segundo *Feinberg & Vogelstein, 1984*. A marcação foi feita durante 1h, a 37°C. As sondas radioativas são separadas dos nucleotídeos livres em colunas de Sephacryl S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech), e a marcação foi monitorada por contagem de CPM de uma amostra da sonda. Como sonda foi utilizado o vetor pSVKS-hbrm. A sonda, correspondente ao controle interno 36B4 (fosfoproteína ribossomal ácida humana PO), foi preparada pela digestão do plasmídeo pGEM36B4cDNA com a enzima de restrição *PstI*, liberando um fragmento de 0,8kbp.

3.13.3. Hibridização e lavagem das membranas

A membrana foi pré-hibridizada com solução Hybridization Solution (Clontech), por 4 horas a 42°C e incubada com a mesma solução contendo as sondas marcadas e desnaturadas, por 16 hs a 42°C.

Após a hibridização, a membrana foi lavada 2x com 2X SSC/0,1% SDS, 68°C por 20 min e 1x com 0,2X SSC/0,1% SDS por 20 min a 68°C.

3.13.4. Revelação das membranas

A membrana foi envolta em plástico e exposta, por diferentes períodos de tempo, a filme de Raio -X, ficando a membrana hibridizada com a sonda radioativa a -70°C ou utilizando-se o sistema de análise de imagem Storm para a detecção das bandas. A quantidade de RNA de cada amostra foi controlada através da hibridização das mesmas membranas com sonda de 36B4.

3.14. Transfecção estável em células de mamífero com DNA plasmideal.

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de Petri com 60 mm de diâmetro e mantidas em meio DMEM contendo 5% SFB, por aproximadamente 16h, a 37°C em atmosfera de 2% CO₂, de forma a atingirem aproximadamente 50-80% da confluência na hora da transfecção. O kit LipofectAMINE PLUS Reagent (Gibco-BRL) foi utilizado para transfecção de 5µg dos DNAs plasmideais de interesse e 0,5µg do DNA plasmideal que confere resistência seletiva a higromicina (p343X). Estes plasmídeos são misturados a 8µL do reagente PLUS, juntamente com 250µL de DMEM sem soro e incubados por 15 min a temperatura ambiente para a formação do pré-complexo. A lipofectAMINE é adicionada (12µL) e a mistura foi incubada temperatura ambiente por mais 15 min. Esta mistura foi adicionada a cultura, previamente lavada com PBSA e mantida em meio DMEM sem soro. Estas células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 2% CO₂ por 3-6 hs e após esta incubação, foi adicionado SBF, para concentração final de 5%. Após 48 hs as culturas foram divididas e mantidas em meio seletivo, contendo o antibiótico adequado (higromicina: 300µg/ml). Após 15 dias no meio seletivo, as colônias foram

isoladas pelo método de clonagem em anéis. As placas contendo as colônias resistentes a higromicina foram lavadas com PBSA e, em seguida, foram colocados anéis de clonagem em volta das colônias, de forma a separá-las do resto da placa. Uma solução de tripsina foi adicionada sobre a colônia circundada pelo anel e as células foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As células correspondentes a cada colônia foram transferidas para um poço de uma placa de 12 poços e mantidas em meio seletivo. Os clones resistentes foram expandidos e congelados para experimentos posteriores. A expressão dos genes exógenos foi confirmada por reações de RT-PCR (conforme descrito em 3.8.), utilizando-se iniciadores específicos para os genes exógenos transfectados ou Western blot.

3.15. Curva de Crescimento

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

3.16. Crescimento em suspensão de agarose

Foram utilizadas soluções de agarose (1,2% e 0,6%), 2X DMEM e SFB. A agarose foi derretida e mantida em banho de 45°C. Foram misturados 2X DMEM, o soro e a agarose 1,2% de modo a se obter a chamada agarose dura (0,6% agarose em DMEM-5% SFB). Esta solução foi distribuída em bandejas de 24 poços (0,5ml/ poço). Uma suspensão de células foi preparada de modo a se obter células bem isoladas para garantir que cada colônia se origine a partir de uma única célula. Diluições seriadas destas suspensões celulares foram distribuídas (em duplicatas) nos poços contendo a agarose dura. Rapidamente colocou-se a agarose semi-sólida (0,3% agarose em DMEM-5%) por cima das células. Depois de completa a gelificação, a bandeja foi incubada em câmara

úmida, 5% CO₂ a 37°C. No dia seguinte adicionou-se 0,5ml de meio de cultura líquido em cada poço. O meio de cultura líquido foi renovado a cada 3 dias, e ao final de três semanas, as colônias foram analisadas com o auxílio de um microscópio Nikon Diaphot invertido e com contraste de fase. O crescimento foi quantificado pela contagem do número de colônias desenvolvidas.

3.17. Eficiência de plaqueamento em substrato sólido

Suspensões de células foram plaqueadas (em duplicatas) em baixa densidade em placas com 60 mm de diâmetro (2 X 10² e 10³ céls/P60). A cultura foi mantida em DMEM contendo 5% SFB, incubada em câmara úmida, 5% CO₂ a 37°C. O meio foi renovado periodicamente até o aparecimento de colônias macroscópicas (aproximadamente 15 dias). O meio foi removido e foi adicionado 3,7% formaldeído por 5 min, para fixar as células. As colônias foram coradas com violeta cristal, e então, contadas, de acordo com seu tamanho.

3.18. Reagentes e radioisótopos

- Proteína A-Sepharose CL-4B: Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia.
- LipofectAMINE-Plus: Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA.
- Anti-BRG1 policlonal (sc-10768 -Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
- Anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado com peroxidase: Sigma, St. Louis, EUA.
- [³⁵S]-Metionina (1000 Ci/mmoles) e [³²P]-ATP (3000 Ci/mmol): DuPont NEN®.

3.19. Análises estatísticas dos dados

Para a análise de alguns dados obtidos foram realizados os seguintes testes estatísticos:

Teste F (Teste de equivalência de variância de populações de dados): possibilita a análise da variância dos dados obtidos em diferentes populações, classificando-as em variâncias equivalentes ou não.

Teste T de Student (Teste da diferença estatisticamente significativa entre populações de dados): possibilita a análise da diferença entre duas populações de dados, classificando-as em significativamente diferentes ou não. Para a realização deste teste é necessário a definição prévia das variâncias dos dados das populações (Teste F). Foram aceitos valores no intervalo de 95% de confiança, $p < 0,05$.

3.20. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel *et al*, 2002 e Sambrook *et al*, 1989).

Corante Coomassie Blue

0,25% Coomassie Brilliant Blue; 10% ácido acético glacial; 45% metanol

Corante Ponceau

0,1% Ponceau; 10% ácido acético glacial

Géis de SDS-poliacrilamida para SDS-PAGE, Western blot

Fase de corrida: 6, 10 e 12% acrilamida a 30:1 (29 partes de acrilamida para 1 de N-N'-metilenebisacrilamida); 375 mM Tris.Cl (pH 8,8); 0,1% de SDS; 0,1% persulfato de amônio; 0,04-0,08% de TEMED;

Fase de empilhamento: 5% acrilamida (30:1); 125 mM Tris.HCl (pH 6,8); 0,1% SDS; 0,1% de persulfato amônio; 0,1% de TEMED.

Meio LB para cultura de bactérias

1% Triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl. No preparo do meio sólido, adicionar 1,5% de agar.

MOPS 5x concentrado

0,2 M MOPS; 50 mM acetato de sódio; 5 mM EDTA

Solução alcalina de lise

0,2 N NaOH; 1% SDS

Solução de cloreto de Césio, pH 5,0

5,7 M de cloreto de césio; 25 mM acetato de sódio

Soluções de lavagem para imunoprecipitação

Solução A: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,2% NP40

Solução B: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,2% NP40

Solução C: 10 mM Tris-HCl pH 7,5

Solução salina fosfato-PBS

0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 8,0 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄; 0,4 mM MgCl₂; 0,9 mM CaCl₂, tamponada pH 7,2. Pode ser preparado sem CaCl₂ e MgCl₂, sendo denominado PBSA.

Tampão de amostra para DNA (5X)

50% glicerol; 0,125% azul de bromofenol; 0,125% xileno cianol

Tampão de amostra para proteínas (2X)

100 mM Tris.HCl pH 6,8; 20% glicerol; 2% SDS; 10% β-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol

Tampão de bloqueio para Western blot

5% leite em pó desnatado, em TBS.

TBS "Tris buffered saline"

150 mM NaCl; 50 mM Tris.HCl (pH 7,5). Adicionando-se 0,1% Tween, chamamos de TBST

Tampão boro-EDTA para eletroforese - TBE (5x concentrado)

446 mM trizma base; 445 mM ácido bórico

Tampão de corrida para SDS-PAGE

25 mM TrisCl (pH 8,0); 250 mM glicina (pH 8,3); 0,1% SDS

Tampão de extração nuclear, pH 7,9

20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,4 M NaCl; 1,0 mM EDTA; 1,0 mM EGTA; 1,0 mM DTT

Tampão GET pH 8,0

50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA;

Tampão hipotônico, pH 7,9

10 mM Hepes; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1,0 mM DTT

Tampão de lavagem p/ proteínas do sistema pET, pH 7,9

160 mM Tris-HCl; 4 M NaCl; 480 mM Imidazol

Tampão de ligação de proteínas do sistema pET, pH 7,9

160 mM Tris-HCl; 4 M NaCl; 40 mM Imidazol

Tampão de lise desnaturante para imunoprecipitação

5% SDS; 70 mM 2-mercaptoetanol; 50 mM Tris-HCl pH 7,5

Tampão de lavagem p/ proteínas do sistema pET, pH 7,9

160 mM Tris-HCl; 4 M NaCl; 480 mM Imidazol

Tampão de lise para RNA, pH 7,0

4 M isocianato de guanidina; 25 mM citrato de sódio; 0,1 M beta-mercaptoetanol

Tampão Ripa-menos

1% NP40; 1% deoxicolato de sódio; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM ortovanadato de sódio; 20g/ml aprotinina; 20g/ml pepstatina

Tampão Ripa-mais

Acrescentar 0,2% SDS ao tampão Ripa menos.

Tampão de transferência pH 8,3 para Western blot

48 mM Tris-Base; 39 mM glicina; 20% metanol; 0,037% SDS

Tampão TE

10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

Tampão Tris-Acetato-EDTA para eletroforese-TAE (pH7,5)

10 mM EDTA pH 8,0; Tampão TE pH 8,0; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0

20X SSC, pH 7,0

3 M NaCl; -0,3 M citrato trisódico 2 hidrato

4.1. Produção e Caracterização de anti-soro contra Brm e BRG1.

4.1.1. Subclonagem de fragmento de cDNA de hBRG1 em vetor de expressão bacteriano pET32c.

Para a obtenção do inserto, optou-se pela utilização das enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* (figura 6) para digestão da construção pSVKS-hBRG1. Esta digestão libera, entre outros, dois fragmentos (1,5 e 1,6 kpb), que possuem, nas extremidades, sítios para *EcoRI* e *HindIII*, como pode ser observado na figura 6. O fragmento de 1,6 kpb corresponde a uma região que codifica para a região central da proteína BRG, o domínio de ATPase, que é muito conservada entre proteínas que possuem atividade ATPásica. Deste modo, para a produção de um anti-soro mais específico para a proteína BRG1, o fragmento utilizado foi o de 1,5 kpb, que corresponde à região codificadora da região carboxi-terminal. Este fragmento foi fracionado em gel de agarose 0,8%, purificado e subclonado no vetor pET32c. O sistema pET32 de expressão em bactérias possui um múltiplo sítio de clonagem e códons nas três diferentes fases de leitura, que são representados pelo sufixo a, b e c. O vetor de expressão escolhido foi o pET32c, o qual apresenta-se em fase com o quadro de leitura do referido fragmento de hBRG1. A subclonagem foi feita nos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *HindIII* (figura 6), possibilitando a clonagem do cDNA na orientação senso. Esta construção foi utilizada para a transformação de bactérias JM109. Foram obtidos clones na placa contendo ampicilina (o vetor confere resistência a este antibiótico), tendo sido encontrados clones positivos para a construção pET-brg nas duas primeiras colônias analisadas. A confirmação do sucesso da subclonagem se deu por análise do DNA plasmideal, o qual foi digerido com as enzimas *NotI* ou *XhoI*, apresentando o padrão esperado para a construção pET-hbrg, conforme mostrado na figura 6. Assim, digestão da construção pET-hbrg com a enzima *XhoI* deveria apenas linearizar a construção, de aproximadamente 7,5 kpb (Figura 7, canal 2). Já a digestão com a enzima *NotI*, deve liberar dois fragmentos de aproximadamente 7,0 e 0,47 kpb, o que pode ser observado na Figura 7, canal 3.

A digestão do vetor pET32c, nos dois casos, apenas linearizaria o mesmo, que possui aproximadamente 5,9 kpb (Figura 7, canais 5 e 6).

Figura 6. Esquema da subclonagem do fragmento *EcoRI-HindIII* de *hBRG1* (1,5 kpb) no vetor de expressão pET32c

Figura 7. Diagnóstico de restrição do DNA plasmideal do clone pET-hbrg. Eletroforese em gel de agarose de um clone positivo para a transformação com a construção pET-hbrg. 1- padrão 1kb "ladder" (GIBCO-BRL); 2- pET-hbrg digerido com Xho I; 3- pET-hbrg digerido com NotI; 4- pET-hbrg não digerido; 5- pET32c digerido com XhoI; 6- pET32c digerido com NotI; 7- pET32c não digerido.

4.1.2. Seqüenciamento da construção pET-brg para comprovação da integridade da seqüência do clone pET-brg.

A seqüência utilizada para a construção dos iniciadores é aquela indicada pelo fabricante do sistema pET32c (Novagen, Inc). Estas seqüências

Figura 8. Sequência senso do fragmento de *hBRG1*, subclonado no vetor de expressão pET32. Sequência obtida em reação onde foi utilizado o iniciador S-Tag, a sequência correspondente à região de subclonagem do vetor pET32 é representada em letras maiúsculas. Em letras minúsculas está representada a comparação da sequência obtida (em preto) com a sequência da região correspondente ao cDNA de *hBRG1*, encontrada na literatura (em azul). Em vermelho, regiões que diferem na leitura. As setas em vermelho mostram a região onde os iniciadores S-Tag (senso) e T7 (antisense) pareiam com o vetor. O fragmento de *brg* (3317-4849) foi inserido entre os sítios para as enzimas *EcoRI* e *NotI*.

Papel de BRG1 e Brm na Reversão Fenotípica de células ST1 - 51 -

Com estas reações foram seqüenciadas aproximadamente 162 pb, correspondentes exclusivamente ao fragmento de *hbrg*, junto a uma seqüência de aproximadamente 50 pb correspondente a seqüência do vetor. A seqüência obtida permitiu avaliar que o quadro de leitura para tradução apresentava-se correto. A seqüência do inserto apresentou mais de 88% de similaridade com a região esperada da seqüência do cDNA de *hBRG-1*, presente na literatura (figura 8).

Foram feitas 3 reações de seqüenciamento, com o iniciador pET-T7 (figura 8). A seqüência obtida com esta reação corresponde à região final do fragmento de *hBRG1* (3317-4849 pb) subclonado no vetor pET32c. Com estas três reações, foi possível obter a seqüência de aproximadamente 350 pb do fragmento de *hBRG1*. Estas seqüências possuem mais de 98% de identidade com a região esperada do cDNA do gene *hBRG1* (começando no 4851 até o 4500 pb), encontrada na literatura. O cromatograma (figura 9A) obtido nestes seqüenciamentos foi também analisado visualmente, permitindo determinar que, provavelmente, os 2% de bases que diferem do cDNA encontrado na literatura podem ser devidos à falha na leitura do cromatograma pelo programa, e não a uma real diferença de seqüências. Assim, por exemplo, na figura 9A, na região sublinhada de azul, o programa leu um N (letra adicionada à seqüência quando o programa não é capaz de identificar uma base específica) entre um C e um G, porém ao olhar no cromatograma é possível observar que não existe nenhum pico entre os picos de C (azul) e G (preto), sendo, provavelmente, um erro de leitura, o que indica que a seqüência nesta região seria igual àquela encontrada na literatura para *BRG1* (figura 9B, em vermelho).

As diferenças entre as seqüências obtidas nestas reações (tanto correspondentes à região inicial como à final do inserto) para aquela encontrada na literatura, aparecem próximas ao final da reação, onde é comum o aparecimento de artefatos. O importante é que a região inicial apresenta-se correta e em fase de leitura apropriada, desta forma, a expressão da proteína deveria ser como esperado.

Figura 9. Seqüência do fragmento de *hBRG1*, subclonado no vetor de expressão pET32c, obtida em reação onde foi utilizado o iniciador pET-T7.

A: Parte do cromatograma obtido; B: Comparação da seqüência obtida (em azul) com a seqüência da região correspondente ao cDNA de *hBRG-1*, encontrada na leitura (em preto). Em vermelho, região de erro de leitura. A análise da seqüência obtida foi feita utilizando-se o banco de dados BLAST.

4.1.3. Produção e caracterização das proteínas recombinantes Trx-Brg e Trx.

4.1.3.1. Comprovação da expressão das proteínas recombinantes.

No sistema pET, a expressão da proteína recombinante é controlada pelo forte promotor de bacteriófago T7 e o sinal de transcrição é reconhecido pela RNA polimerase de T7, sendo necessário, para a expressão da proteína de fusão, que a bactéria hospedeira possua o gene da RNA polimerase do bacteriófago T7. Sendo assim, a construção pET-*hbrg* e o vetor vazio, pET32c, foram usados na transformação de duas linhagens bacterianas diferentes: BL21 DE3 e JM109 DE3. Estas linhagens possuem o gene da RNA polimerase de T7 sob o controle do *lacUV5*, o qual é induzido por adição de IPTG ao meio. A transformação das duas linhagens bacterianas foi obtida com sucesso.

As bactérias foram induzidas à expressão protéica por IPTG e a proteína em fusão com Trx (tireodoxina) foi purificada seguindo-se o protocolo descrito no manual do sistema pET (Novagen, Inc). Tanto a proteína Trx como Trx-Brg foram expressas com sucesso, o que foi constatado por SDS-PAGE e Western blot. Em SDS-PAGE comparando os canais de bactérias transformadas com pET-*hbrg* induzidas e não induzidas à produção protéica (figura 10, canais 2 e 1 respectivamente) é possível observar a presença de uma proteína de aproximadamente 87 kDa, nas bactérias induzidas, que é o tamanho esperado para a proteína Trx-Brg. Nota-se, também, que a maior parte desta proteína permaneceu no material insolúvel (figura 10, canal 3) e sobrenadante após incubação com a resina (figura 10, canal 4), ficando pouca proteína aderida à resina (figura 10, canal 5), indicando que o protocolo de purificação da mesma deveria ser melhorado. Outro fato importante é que esta banda de 87 kDa não é observada nas bactérias transformadas com o vetor vazio (figura 10, canais 6 a 10), somente a proteína Trx (25 kDa) pode ser observada neste caso.

Figura 10. Análise da expressão e purificação da proteína Trx-Brg. Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (10%) das proteínas de fusão do sistema pET. Bactéria não induzida à produção protéica (canais 1 e 6); bactéria induzida à produção protéica (canais 2 e 7); material insolúvel (canais 3 e 8); sobrenadante (canais 4 e 9); proteína ligada à resina (canais 5 e 10); padrão de peso molecular (canal 11). As proteínas foram visualizadas por Coomassie blue.

Para verificar se a proteína de aproximadamente 87 kDa corresponderia à proteína de fusão Trx-Brg, foi feito um Western blot utilizando-se um anticorpo monoclonal que reconhece a cauda de 6 resíduos de histidina, os quais devem estar presentes nas proteínas de fusão expressas no vetor pET32c. Amostras de extratos bacterianos, de bactérias induzidas (ou não) à produção protéica, foram analisados. O resultado do Western blot (Figura 11) mostra que o anti-soro reconheceu tanto a proteína de fusão Trx (25 kDa), canais 1, 2 e 8, como a proteína de Trx-Brg (87 kDa) nos canais 3, 4 e 6, comprovando que proteínas de fusão, com uma cauda de 6 resíduos de His,

estão sendo expressas nas linhagens bacterianas (JM109 DE3 e BL21 DE3) transformadas com as construções de interesse. Este ensaio também mostrou que as linhagens JM109 DE3 (figura 11, canais 1-4) expressam as proteínas Trx (1 e 2) e Trx-Brg (3-4) mesmo quando não são induzidas por IPTG (canais 1 e 3), o mesmo não sendo verificado para a linhagem BL21 DE3 (canais 5-8). A linhagem JM109 DE3 também apresenta menor velocidade de crescimento, o que não ocorreu com a linhagem BL21, sendo assim optamos por trabalhar com a linhagem BL21 DE3.

Figura 11. Western blot para confirmar a expressão de proteínas de fusão com cauda de histidina no sistema pET. Extratos de bactérias não induzidas à expressão protéica de: Trx (canais 1 e 7); Trx-Brg (canais 3 e 5) ou bactérias induzidas à expressão protéica de: Trx (canais 2 e 8); Trx-Brg (canais 4 e 6), foram fracionados em gel de SDS-poliacrilamida (10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti-His.

4.1.3.2. Obtenção e purificação da proteína Trx-Brg1 e Trx em média escala.

Após a comprovação da expressão da proteína de fusão Trx-Brg, o primeiro passo foi fazer uma cinética, onde foi possível comparar a produção da proteína Trx-Brg, em diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5 e 6 h) de indução por adição de IPTG ao meio. O tempo escolhido para a produção foi o de 5h de indução com IPTG, onde a indução apresenta-se mais alta (dados não apresentados).

O segundo passo foi à produção da proteína em média escala e o aprimoramento das técnicas de purificação da mesma. Nas sucessivas produções da proteína Trx-Brg, sua purificação foi melhorada. As figuras 12A, B e C apresentam diferentes estratégias de purificação, variando-se os tampões utilizados para lavagem das proteínas inespecíficas aderidas à resina e modificações no modo de lise das bactérias. A figura 12C corresponde à melhor purificação obtida da proteína Trx-Brg, o que pode ser notado pelo aparecimento majoritário da proteína Trx-Brg, nos canais correspondentes as proteínas eluídas da resina, quando comparado com as outras purificações (figuras 12A e B).

Na purificação mostrada na figura 12C, a lise bacteriana foi melhorada, para diminuir a perda da proteína de interesse junto ao material insolúvel, incubando-se a suspensão bacteriana com lisozima, antes da sonicação. Apesar do material insolúvel ainda conter um pouco da proteína Trx-Brg, como pode ser visto na figura 12C (canal 3) a quantidade é menor do que aquela encontrada nas outras condições de purificação (figura 10, 12A e B).

Outro problema era a ineficiência na ligação da proteína recombinante à resina quelante de Ni^{+2} , pois, observou-se que uma parte da proteína de interesse estava presente no material solúvel, após este ter sido incubado com a resina (figura 10). Este problema passou a ser contornado adicionando-se um novo ciclo de incubação do sobrenadante com a resina. Para diminuir a perda da proteína de interesse durante as lavagens, foram feitos testes com diferentes concentrações de imidazol no tampão de lavagem. O tampão recomendado para a lavagem das resinas contém 480 mM de imidazol, porém,

nesta concentração, havia perda excessiva de material nas lavagens, pois juntamente com outras proteínas inespecíficas estava sendo eluída a proteína Trx-Brg (figura 12A). Foram testadas, então, tampões com concentrações mais baixas de Imidazol, com 50 mM e 300 mM. O tampão de 50 mM, apesar de diminuir a perda da proteína Trx-Brg durante a lavagem (figura 12B), não foi suficientemente eficiente, ficando ligadas à resina muitas proteínas inespecíficas, as quais foram eluídas juntamente com Trx-Brg. A concentração de Imidazol escolhida para o tampão de lavagem foi 300 mM de Imidazol, que apresentou maior eficiência de lavagem de proteínas inespecíficas e menor perda da proteína de interesse, como pode ser observado na figura 12C, canais 1^a, 2^a e 3^a lavagens. Os rendimentos protéicos obtidos em diferentes produções da proteína recombinante são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Rendimento (mg de proteína/l de suspensão bacteriana) de diferentes produções das proteínas Trx e Trx-Brg.

	mg/l de Trx-Brg	mg/l de Trx
1 ^a produção	3,9	25,6
2 ^a produção	1,1	
3 ^a produção	0,5	
4 ^a produção	0,7	
5 ^a produção	1,0

Figura 12. Análise das etapas de purificação da proteína Trx-Brg. Uma amostra de cada etapa da purificação (3 purificações distintas) foi submetida à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e as proteínas foram coradas com Coomassie blue. A: Lavagens com tampão 480 mM Imidazol; B: lavagens com tampão 50 mM Imidazol; C: lavagens com tampão 300 mM Imidazol. 1- bactérias não induzidas; 2-bactérias induzidas; 3-material insolúvel; 4-material solúvel; 5-1ª lavagem; 6-2ª lavagem; 7-3ª lavagem; 8-1ª eluição; 9-2ª eluição; 10-3ª eluição e 11-4ª eluição.

4.1.4. Imunização e coleta do anti-soro policlonal contra a proteína Trx-Brg.

Após a padronização da expressão e purificação, foi possível obter a proteína Trx-Brg purificada, com poucas proteínas contaminantes, a qual foi utilizada para inoculação de uma coelha. As inoculações foram realizadas (conforme item 3.9.2.3.) de forma intramuscular e intradérmica, na presença do adjuvante de Freund. Após um período de 4 semanas, foi realizada uma primeira coleta de sangue e foi feita a inoculação de reforço; coletas posteriores foram feitas segundo a tabela 3. O sangue do animal foi processado conforme item 3.9.2.1. e o anti-soro foi aliquotado (1, 0,5 e 0,2 ml) e estocado a -70°C. De um modo geral, as coletas apresentaram-se pouco ou não hemolisadas, tanto de soro pré-imune como de soro imune, demonstrando que o método de extração do soro foi adequado. Na tabela 3, é possível observar a relação entre quantidade de sangue coletado e quantidade de soro obtida.

Tabela 3. Dados das coletas e imunizações de coelhas fêmeas com a proteína Trx-Brg.

Dia	Operação	Sangue (ml)	Soro (ml)
1	Coleta de soro pré-imune	3,0	1,5
6	Coleta de soro pré-imune	5,0	2,5
6	Imunização-intramuscular/subcutânea	-	-
23	1ª coleta de anti-Brg	10,0	4,5
30	2ª coleta de anti-Brg	5,0	2,5
41	1ª inoculação de reforço	-	-
41	3ª coleta de anti-Brg	5,0	2,5
50	4ª coleta de anti-Brg	6,0	3,0

4.1.5. Caracterização da reatividade e especificidade do anti-soro anti-Brg em ensaios de Western blot

4.1.5.1. Reatividade contra a proteína recombinante Trx-Brg.

A reatividade do anti-soro foi testada, primeiramente, contra a proteína recombinante, em ensaios de Western blot. O anti-soro mostrou ser capaz de reconhecer a proteína Trx-Brg (figura 13), pelo aparecimento de uma banda de 87 kDa nos canais correspondentes a extrato de bactérias induzidas à produção protéica, por IPTG. A especificidade da reação foi comprovada pelo não reconhecimento desta banda nos canais que foram incubados com o soro pré-imune. A mesma banda é reconhecida pelo anti-soro anti-His (dados não apresentados), o qual reconhece a cauda de histidina presente na proteína recombinante. Neste Western blot (figura 13) foram testadas todas as coletas obtidas até agora, sendo possível perceber um aumento do título ao longo da imunização. A mesma diluição foi utilizada em todas as coletas, porém, nas últimas, a reatividade do anti-soro é muito maior, sendo este anti-soro, capaz de reconhecer fortemente a proteína, mesmo nos canais que contem extrato de bactéria não induzida à produção protéica, onde a proteína deve estar em baixa concentração, o mesmo não acontecendo com o anti-soro da primeira coleta.

Figura 13. Western blot para análise da reatividade do anti-soro anti-Brg contra a proteína recombinante Trx-Brg. Amostras de bactérias induzidas (ou não) à produção da proteína Trx-Brg (por adição de IPTG ao meio) foram fracionadas em SDS-poliacrilamida (10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com diferentes coletas do anti-soro anti-Brg, diluído 1:500 em TBST, As bandas correspondentes à proteína Trx-Brg são apontadas na figura.

4.1.5.2. Reatividade do anti-soro anti-Brg contra as proteínas homólogas de SWI2/SNF2 celulares.

A produção deste anti-soro teve como principal finalidade sua utilização no estudo da ação da proteína BRG1 em modelos celulares de mamífero, principalmente das células ST1, portanto, é importante que o anti-Brg seja capaz de reconhecer a proteína celular em imunoenaios. O resultado preliminar de Western blot (figura 14), onde lisado protéico total foi utilizado, mostrou que o anti-soro (1ª coleta) é capaz de reconhecer a proteína hBRG1 em extrato protéico de células HeLa (linhagem celular humana), pelo aparecimento de uma banda de aproximadamente 200 kDa, a qual deve corresponder a proteína hBRG1 (figura 14). Neste mesmo experimento, foram usados extratos protéicos de células ST1 na ausência ou na presença de hidrocortisona e carenciadas (ou não) para SBF (figura 14), porém não foi possível observar a mesma proteína nestes extratos, apenas uma banda de menor peso molecular pode ser observada em algumas condições nestas células, a qual poderia corresponder à homóloga, em rato, de hBRG1 ou hBrm. Para melhorar a visualização das proteínas de interesse, Brm e BRG1, passou-se a testar outras coletas de anti-Brg (figura 15), as quais apresentam um título maior (figura 13), podendo apresentar maior reatividade tanto contra a proteína celular humana como contra a de rato.

A proteína BRG1 apresenta aproximadamente 200 kDa (Khavari *et al*, 1993; Östlund *et al*, 1997 e Gelius *et al*, 1999), e para Brm, o tamanho esperado é de aproximadamente 190 kDa (Muchardt & Yaniv, 1993). Tanto o anti-soro da 3ª como da 4ª coleta mostraram ser capazes de reconhecer uma proteína de aproximadamente 190 kDa, a qual poderia corresponder a proteína Brm, tanto em células HeLa como em ST1 (figura 15, respectivamente canais 1, 3 e 4). Em alguns ensaios, há o aparecimento de uma banda acima do marcador de peso molecular de 192 kDa, a qual pode corresponder à proteína BRG (resultado não apresentado).

Figura 15. Western blot de extratos protéico celulares para avaliar a reatividade do anti-soro anti-BRG (3^a coleta) contra proteínas celulares (BRG e Brm). Os lisados de células ST1 foram obtidos a partir de culturas mantidas em 5% de SFB e na ausência ou na presença de Hy, por diferentes tempos (indicados na figura). Os lisados de células HeLa foram obtidos de culturas mantidas em 10% de SBF. O anti-soro (anti-Brg 3^a coleta) foi usado em uma diluição de 1:1000 em TBST. As bandas correspondentes à proteína Brm (185 kDa) estão apontadas na figura.

4.1.5.3. *Comprovação da identidade da proteína celular reconhecida pelo anticorpo anti-BRG em células HeLa.*

O anti-soro anti-Brg apresenta reatividade contra outras proteínas bacterianas, além da proteína Trx-Brg (figura 13), portanto, não foi possível determinar se o anticorpo contra a proteína Trx-Brg seria o mesmo que reconhece as proteínas de 200 e 190 kDa celular (figura 14 e 15). Para fazer esta análise, primeiramente, o anti-soro anti-Brg (3ª coleta) foi diluído 1:1000 (diluição utilizada nos ensaios de Western blot contra proteína celular) e dividido em dois tubos, um deles foi incubado com uma membrana de nitrocelulose contendo a proteína Trx-Brg imobilizada, para a pré-adsorção e retirada de anticorpos específicos contra a mesma. O outro foi incubado com uma membrana limpa (nenhuma proteína imobilizada), para controle negativo, e estes anti-soros foram utilizados para um ensaio de Western blot (figura 16).

O tratamento foi capaz de abolir completamente a reatividade do anti-soro anti-Brg pré-adsorvido com a proteína celular de 185 kDa, em lisados de células HeLa (figura 16A, canal 3). No canal correspondente ao mesmo lisado de células HeLa (figura 16A, canal 1) incubado com o anti-soro não adsorvido, a proteína de 185 kDa continua sendo reconhecida. A pré-adsorção, não foi suficiente para abolir completamente a reatividade contra a proteína de fusão (Trx-Brg), mas somente diminuir, como pode ser visto na figura 16B (onde o filme foi exposto por um tempo muito menor do que na figura 16A), comparando-se os canais correspondentes ao anti-soros pré-incubado (figura 16B, canal 4) e não com a proteína Trx-Brg (figura 16B, canal 2). Este anti-soro é mais reativo contra a proteína de fusão, pois foi obtido a partir da mesma, portanto é necessário utilizar maior concentração da proteína Trx-Brg, para eliminar completamente esta reatividade. Este ensaio foi repetido duas vezes, apresentando os mesmos resultados.

Figura 16. Western blot para comprovar a especificidade da reatividade do anti-soro anti-Brg contra a proteína celular em HeLa. Dois ensaios de Western blot foram feitos, uma membrana foi incubada com o anti-soro, anti-Brg (1/1000) (canais 1 e 2). A outra membrana foi incubada com anti-Brg (1:1000) (canais 3 e 4), pré-incubado com a proteína Trx-Brg (2). O resultado foi visualizado utilizando-se o kit ECL quimioluminescente (Amershan Pharmacia) e foram feitos dois períodos de exposição do filme, A: longo período; B: curto período.

Outros ensaios de Western blot foram feitos, para comprovar que a proteína de aproximadamente 190 kDa, reconhecida pelo anti-soro anti-BRG1 é a proteína Brm celular. Nestes ensaios foram utilizadas linhagens celulares de fibroblasto de camundongo, normal (A31), na presença e na ausência de FBS, ou transformada pelo o oncogene MT do vírus polioma (MTWT). A figura 17, é uma quantificação do resultado obtido neste experimento, onde se verifica que a proteína reconhecida por anti-BRG1 tem sua concentração aumentada em núcleos de células A31 carenciadas para FBS, e esta reduzida no núcleo de células tratadas com FBS ou transformadas por MT do vírus polioma. Células transformadas por este antígeno têm os níveis de Brm muito baixo, quase indetectáveis da proteína Brm (Muchardt *et al*, 1998).

Figura 17. Quantificação da proteína Brm em fibroblastos de camundongo. O gráfico representa a quantificação em unidades relativas [“PhosphorImager” (Storm® Molecular Dynamics)], da intensidade das bandas relativas à proteína Brm, reveladas em um ensaio de Western blot. Para esta quantificação foi utilizado o programa ImageQuant. O anti-soro utilizado foi o anti-Brg (3ª coleta). PLJ: fibroblasto normal de camundongo e MTWT: fibroblasto de camundongo transformado pelo oncogene MT.

4.1.6. Ensaio de imunoprecipitação para caracterização do anti-Brg e otimização da técnica.

Ensaio de Imunoprecipitação foram feitos para otimização da técnica, assim como para auxiliar a confirmação da especificidade do anti-BRG, em relação às proteínas BRG e Brm. A reatividade do anticorpo foi analisada por dois protocolos diferentes, para testar se o anti-Brg é capaz de funcionar em condições desnaturantes e não desnaturantes. Os lisados utilizados foram de células HeLa, pois, sabidamente, esta linhagem expressa tanto hBrm como BRG1. Além disso, sendo uma linhagem humana, haveria uma maior especificidade do anti-soro em relação às proteínas de interesse. O anticorpo funcionou com os lisados de proteínas não desnaturadas, como pode ser visto na figura 18 (canal 7), onde se pode observar o aparecimento de uma banda de aproximadamente 200 kDa, a qual provavelmente corresponde a proteína BRG1. A especificidade desta banda é confirmada pelo não aparecimento da mesma no canal correspondente ao mesmo lisado incubado com o soro pré-imune (Figura 18, canal 5). Ainda com relação ao canal 7, pode-se observar uma banda bem fraca, de aproximadamente 190 kDa (apontada pela seta) a qual poderia corresponder à proteína hBrm. Neste mesmo são observadas outras proteínas, as quais podem ser proteínas que interagem com BRG ou Brm, como a de aproximadamente 100 kDa, que poderia corresponder tanto à proteína Rb como a outra proteína que se associa a BRG ou Brm, como por exemplo, BAF 110 kDa (Wang *et al*, 1996). Os canais correspondentes aos lisados desnaturado não apresentaram bandas específicas (figura 18, canais 2, 3 e 4), portanto, adotou-se o protocolo de imunoprecipitação utilizando-se lisados não desnaturado.

Figura 18. Imunoprecipitação das proteínas homólogas em mamífero de SWI2/SNF2 (*Saccharomyces cerevesiae*), pelo anti-soro anti-Brg. Células HeLa tiveram suas proteínas marcadas com ^{35}S . Os lisados foram obtidos de duas formas: desnaturado (canais 2, 3 e 4) e não desnaturado (canais 5 e 7). O anti-soro (anti-Brg 3ª coleta) e soro pré-imune foram utilizados na diluição 1/25 (canais 2 e 3) e 1/50 (canais 4, 5 e 7). O canal 6 corresponde a um lisado incubado apenas com "beads", como controle negativo. As bandas correspondentes à; Brg ($\cong 200$ kDa), Brm ($\cong 190$ kDa), estão apontadas na figura. Os extratos protéicos foram fracionados em SDS-poliacrilamida (6%).

Em novos ensaios de Imunoprecipitação, foram obtidas mais evidências que as proteínas reconhecidas por anti-Brg correspondem mesmo à BRG1 ou a hBrm. No ensaio apresentado na figura 19, foram utilizadas as linhagens A31 quiescentes, reestimuladas com 20% SFB por 2h e B61 (células A31 transformadas com EJ-*ras*) (Kovary *et al*, 1989). O anti-soro reconheceu uma banda, larga, de aproximadamente 190 kDa (figura 19) no canal correspondente ao lisado de células A31 reestimulada com soro por 2h. A proteína mBrm (Brm de camundongo) é acumulada no núcleo de fibroblasto de camundongos quiescentes (Muchardt *et al*, 1998), e passa a ser fosforilada quando as células voltam a ciclar, sendo degradada após 10h, o que poderia explicar porque a banda observada é larga. A mesma banda não é observada no lisado de células B61 imunoprecipitado com o mesmo anti-soro (Figura 19, canal 4), o que indica mais uma forte evidência de que esta banda corresponde à proteína mBrm, pois células transformadas pelo oncogene *ras* não expressam mBrm (Muchardt *et al*, 1998). Em ambos lisados, incubando-se com anti-Brg (canais 2 e 4) ocorre o aparecimento de uma banda de aproximadamente 200 kDa, a qual deve corresponder a mBRG, pois esta proteína não tem sua expressão alterada em nenhuma condição. A especificidade das duas bandas é confirmada pelo não aparecimento da mesma nos canais de lisados imunoprecipitados com soro pré-imune (Figura 19, canais 1, 3 e 5). Além disso, foram utilizados lisados desnaturado de proteína, o que evitou o aparecimento de proteínas que estivessem sendo co-imunoprecipitadas.

Figura 19. Imunoprecipitação das proteínas homólogas de SWI2/SNF2 (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizando lisados de células B61 e A31. O anti-soro anti-Brg (3ª coleta) ou pré-imune foi utilizado na diluição de 1:50. As proteínas foram marcadas com ^{35}S metionina, 2hs antes da lise. As bandas, provavelmente correspondentes a mBrg ($\cong 200$ kDa) e para mBrm ($\cong 188$ kDa) são apontadas na figura. Os extratos foram fracionados em SDS-poliacrilamida 6%.

4.2. Análise da composição do complexo SWI/SNF em células ST1 e P7.

Como mencionado anteriormente, as proteínas BRG1 e Brm fazem parte de um complexo multiprotéico SWI/SNF, o qual tem uma composição variada de seus componentes, o que influi em sua atividade. Para analisar a composição dos complexos SWI/SNF das células ST1 e P7, foram feitos ensaios de imunoprecipitação (IP). Nestes ensaios foram utilizados lisados não desnaturante, de tal forma que, se as proteínas BRG1 e Brm estivessem associadas a outras proteínas, estas seriam co-imunoprecipitadas pelo anticorpo anti-BRG. As bandas reveladas na figura 20 foram analisadas pelo programa ImageQuant (Molecular Dynamics), para comparação de intensidades e correção do ruído de fundo da imagem.

As células ST1 e P7 foram tratadas por diferentes períodos de tempo com Hy (figura 20). Tanto uma banda de aproximadamente 200 kDa (rBRG), como uma, de aproximadamente 190 kDa (rBrm), estão sendo imunoprecipitadas pelo anticorpo (apontadas por setas na figura 20). Como controle positivo, foi utilizada a linhagem humana HeLa. A banda de 200 kDa parece não estar sofrendo modulação pelo tratamento com Hy, tanto nas linhagens ST1 como na P7. Assim, as diferenças observadas parecem estar mais ligadas a um problema na quantidade total das amostras, como no caso do canal correspondente às células ST1 tratadas por 10 h com Hy (ST1 10 h Hy), onde todo o canal parece estar superexposto, não podendo ser afirmado que esta proteína esteja sendo mais expressa nesta condição. Nos canais correspondentes às células P7 sem tratamento (P7) e P7 tratada por 10h com Hy (P7 10h Hy) há uma aparente diminuição na intensidade de ambas as bandas (200 e 190 kDa), porém pode ser observado que há uma diminuição em todo o "background" na altura destas duas bandas. Neste ensaio, a banda correspondente a BRG (200 kDa) não parece estar presente na linhagem humana HeLa. Por outro lado, a banda correspondente a Brm (190 kDa) está presente, tanto em células HeLa como nos outros lisados, não parecendo ser modulada pelo tratamento com Hy, o mesmo acontecendo para as células P7.

Pode-se observar, que outras bandas também são imunoprecipitadas neste ensaio (figura 20). Uma proteína de aproximadamente 160 kDa, parece estar sendo fortemente co-imunoprecipitada com as proteínas Brm e/ou BRG. O mais interessante é que ela aparece muito fortemente no lisado de células P7 sem tratamento com Hy e diminui, drasticamente, nas outras condições. Esta banda está presente também nos lisados de células ST1, parecendo ter sua intensidade aumentada com o tratamento com Hy.

Figura 20. Análise da composição do complexo SWI/SNF em células ST1 e P7. Imunoprecipitação de proteínas homólogas em mamífero de SWI2/SNF2 (*Saccharomyces cerevesiae*), pelo anti-soro anti-Brg. Células HeLa, ST1 e P7, as bandas correspondentes à proteína de ≈ 200 kDa e de ≈ 190 kDa, estão apontadas na fig. Os extratos protéicos foram fracionados em SDS-poliacrilamida 6%.

Outra proteína que também parece estar sendo co-imunoprecipitada, é uma de aproximadamente 108 kDa (figura 20), que poderia corresponder, a pRb. A autenticidade das bandas é comprovada pela utilização de soro pré-imune como controle negativo (figura 20). Para avaliar se a proteína pRb poderia estar fazendo parte do complexo SWI/SNF, nestas células, foram feitos ensaios de imunoprecipitação, utilizando anticorpo anti-Rb C36 (Santa Cruz). Primeiramente, para comprovar que o anticorpo utilizado era capaz de imunoprecipitar pRb, foi feito um ensaio, utilizando lisados não desnaturantes, de proteínas marcadas radioativamente (figura 21A). Junto a pRb (108 kDa), foram co-imunoprecipitadas outras proteínas de alto peso molecular (250; 230; 190; 160 kDa), porém, não foi possível detectar diferenças na intensidade destas proteínas entre as linhagens e condições analisadas (figura 21A). Após imunoprecipitação, com o anti-soro anti-Rb, as proteínas foram fracionadas em gel e transferidas para membrana de nitrocelulose, procedendo-se um Western blot, utilizando-se o anticorpo anti-Brg (figura 21B). O anti-soro anti-Brg não foi capaz de reconhecer nenhuma proteína que estivesse sendo co-imunoprecipitada com pRb, de maneira diferencial, entre células P7 e ST1, apesar de uma banda de aproximadamente 185 kDa (figura 21B), ser muito fracamente detectada em células ST1. Devido à baixa intensidade da banda, não é possível tirar conclusão nenhuma.

Figura 21. Imunoprecipitação da proteína pRB para identificação de proteína co-imunoprecipitadas. Nestes ensaios foram utilizados lisados protéicos de células ST1 e P7, na ausência ou na presença de Hy, e células HeLa. A: Imunoprecipitação de pRb, utilizando extrato de proteínas marcadas radioativamente, e anticorpo monoclonal anti-pRB (C36, Santa Cruz). B: Após reação de imunoprecipitação, foi feito um ensaio de Western blot (utilizando anti-Brg). Os extratos foram fracionados em SDS-poliacrilamida 6%.

4.3. Análise da expressão das proteínas Brm e BRG em células ST1 e P7, após tratamento com Hy.

Com a finalidade de estudar o papel das proteínas Brm e BRG1 na reversão fenotípica da linhagem celular ST1, induzida pelo tratamento com hidrocortisona (Hy), e tendo em mãos um anti-soro capaz de reconhecer estas proteínas em células de mamífero, ensaios de Western blot, foram realizados utilizando lisados de células ST1 e P7 na ausência e na presença de Hy, 100 ng/ml, por diferentes períodos de tempo. As proteínas BRG e Brm, são proteínas nucleares, portanto, foram feitos ensaios de Western blot utilizando-se extratos de proteínas nucleares. Os extratos contendo as proteínas citoplasmáticas também foram analisados; assim, poderíamos ter certeza que a proteína presente no extrato nuclear, era específica deste compartimento.

O anti-soro anti-BRG reconheceu uma proteína de aproximadamente 190 kDa (figura 22), a qual acreditamos corresponder à proteína rBrm (Brm de rato). Esta proteína é visível apenas nos canais correspondentes ao extrato de proteínas nucleares (figura 22), resultado que reforça a hipótese desta banda corresponder a rBrm, uma proteína nuclear. O fato mais interessante neste ensaio, é que a proteína de 185 kDa, parece ter sua presença regulada pelo tratamento com Hy, somente nas células ST1, as quais são sensíveis a este tratamento. Nos canais correspondentes às células ST1 não tratadas (figura 22, canal 1) e tratadas por 3 hs (figura 22, canal 5) com Hy, pode-se observar que há uma menor concentração da proteína de 185 kDa, quando comparado aos outros canais contendo extratos nucleares (figura 22, canais 6, 7, 9 e 11). Esta concentração aumenta, após 24 hs de tratamento com Hy (figura 22, canal 7), ficando igual à observada nas células P7, onde parece não ocorrer variação alguma ao longo do tratamento com Hy, e nas células HeLa. Ainda com relação aos canais correspondentes as células ST1 não tratada e tratada por 3 h com Hy (respectivamente, canais 1 e 5), outras bandas, menores que a de 185 kDa, também podem ser observadas, as quais poderiam corresponder a pedaços da proteína rBrm degradada. Sabe-se que, após fosforilação, a proteína Brm é degradada em células em divisão mitótica, sendo re-sintetizada quando as células entram em G1, sofrendo um acúmulo em células que estão

em G0 (Muchardt *et al*, 1996). A proteína Brm das células P7 parece apresentar um comportamento anormal, estando esta célula em constante proliferação. Em células ST1 a proteína Brm está sendo acumulada no núcleo após o tratamento com Hy, o qual provoca uma entrada em G0 destas células (Mercado 1997). Ao monitorar a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, notamos que, de uma forma geral, não havia sinais de degradação dos lisados, todos apresentavam o mesmo padrão de bandas, o que excluiria a possibilidade da diferença observada nos canais 1 e 5 ser devida a uma degradação geral das proteínas contidas naqueles lisados (dados não apresentados).

Uma proteína de aproximadamente 200 kDa, também pode ser observada, neste Western blot, somente nos extratos de proteínas nucleares (apontada pela seta na figura 22). Esta proteína pode corresponder à proteína BRG1. A intensidade desta banda parece muito fraca, ficando difícil concluir algo sobre sua expressão ou acúmulo durante o tratamento com Hy das células ST1 e P7. A proteína rBRG também é fosforilada, porém, diferentemente de Brm, não é degradada (Muchardt *et al*, 1996).

Para confirmação e quantificação destes dados, foram feitos novos ensaios de Western blot utilizando o soro anti-BRG, em células ST1 e P7, tratadas ou não com Hidrocortisona (Hy). No ensaio apresentado na figura 23, utilizou-se o kit Vista Fluorescence Western blotting (Molecular Dynamics). Este kit permite que o resultado seja visualizado num “PhosphorImager” (Storm® Molecular Dynamics), podendo ser diretamente quantificado através do programa ImageQuant (Molecular Dynamics). Desta forma, foi possível comparar o comportamento da proteína Brm nestas linhagens, frente ao tratamento com Hy, uma vez que, anteriormente, esta análise foi feita apenas visualmente. Este experimento (figura 23) confirmou que a proteína Brm está em baixa concentração no núcleo das células ST1 mantidas em crescimento exponencial (na ausência de tratamento com Hy) e aumenta significativamente (6X) quando as células ficam bloqueadas na fase G0/G1 do ciclo (após 24h de tratamento com Hy) (Mercado 1997).

No caso da linhagem P7, confirmou-se que ocorre um maior acúmulo de Brm no núcleo destas células, quando comparadas com a linhagem ST1 mantida na ausência de Hy, mesmo estando as células P7 em fase exponencial de crescimento. A barra correspondente ao extrato citoplasmático das células P7 (P7C) foi utilizada como controle negativo do experimento, considerando que a proteína Brm é uma proteína nuclear.

Figura 22. Western blot para análise da expressão das proteínas homólogas de rBRG1 e rBrm em células ST1 e P7. O anti-soro anti-Brg (3ª coleta) foi utilizado na diluição de 1/1000. Foram utilizados dois tipos de extrato protéico para este ensaio: fração citoplasmática (C) e fração nuclear (N). Em cada canal foram aplicados 60 µg de proteína. As bandas, correspondentes à proteína Brm (185 kDa), estão apontadas na figura. Os extratos foram fracionados em SDS-poliacrilamida 6%.

Figura 23. Quantificação da proteína Brm nas linhagens celulares ST1 e P7 antes e após tratamento com o hormônio Hy. O gráfico representa a quantificação em unidades relativas [“PhosphorImager”, Storm® Molecular Dynamics), da intensidade das bandas relativas à proteína Brm, reveladas em um ensaio de Western blot. Para esta quantificação, foi utilizado o programa ImageQuant (Molecular Dynamics).

4.4. Análise do nível dos transcritos de *rbrm* em células ST1 e P7, após tratamento com Hy.

Foram realizados ensaios de Northern blot, para analisar os níveis dos transcritos de *rbrm* nas linhagens ST1 e P7. Como os genes estudados estão envolvidos na regulação do controle do ciclo celular, é comum que seus transcritos sejam pouco abundantes, o que gera a necessidade da utilização de uma amostra enriquecida com RNAm. Amostras de RNAm, purificadas de um total de 100µg de RNA total (obtidas conforme descrito em Material e Métodos), foram fracionadas em gel de agarose-formaldeído. Sendo possível constatar que a quantidade fracionada de cada amostra era semelhante, não havendo degradação visível (dado não apresentado). As amostras fracionadas foram, então, transferidas para membrana de nylon, por capilaridade, por 16h.

A membrana foi hibridizada com uma sonda, marcada radiativamente, correspondente à construção pSVKS-*hbrm* (figura 24A). A análise densitométrica das bandas indicou que os níveis de transcrito de *rbrm* em células ST1 aumentam após tratamento com Hy (figura 24B), mostrando uma relação entre a concentração aumentada da proteína Brm (figuras 22 e 23) com um aumento nos níveis de transcrito de *rbrm*. Para as células P7, os níveis de mRNA de *rbrm* apresentam-se baixos (figura 24), diferindo do observado em nível protéico (figuras 22 e 23), independente do tratamento com Hy. Como controle interno, foi utilizado o cDNA correspondente a 36B4 (fosforiboproteína ácida) para normalização das bandas encontradas no ensaio.

Figura 24. Níveis dos transcritos de *rbrm* nas linhagens celulares ST1 e P7 na presença e na ausência do hormônio Hy. A: Ensaio de Northern blot, após fracionamento do RNAm em gel de agarose-formaldeído e a transferência para membrana de nitrocelulose, foi feita uma hibridização com sonda radioativa correspondente ao gene *hbrm*. B: Quantificação, em unidades relativas, da intensidade das bandas correspondentes ao mRNA de *rbrm*, reveladas em um ensaio de Northern blot. Para esta quantificação foi utilizado o programa ImageQuant (Molecular Dynamics). A normalização foi feita utilizando-se a sonda contra 36B4.

4.5. Síntese de cDNA de células ST1 e P7 e seqüenciamento dos cDNAs correspondentes ao gene *rbrm* destas células.

A partir de amostras de RNA total, extraídas das células ST1 e P7, foram feitas reações de RT-PCR, para obtenção do cDNA correspondente ao gene *rbrm*. Este cDNA foi utilizado como molde para reações de PCR, utilizado-se três pares de iniciadores, os quais compreendem a maior parte do cDNA, conforme esquematizado na figura 25A. As regiões a serem amplificadas correspondem aos nucleotídeos de 1,5 a 3,0 kpb (figura 25A, região 1); 3,0 a 4,5 Kpb (figura 25A, região 2) e 4,0 a 5,0 kpb (figura 25A, região 3). Estes iniciadores foram desenhados baseados em ESTs de rato, depositadas em banco de dados públicos, mostradas na figura 25A.

Com as reações para amplificar fragmentos de *rbrm*, foram obtidos 2 fragmentos, de aproximadamente 1,5 kpb, como pode ser observado na figura 25B. No canal correspondente a região de 3 a 4,5 kpb (figura 25A, região 2), tanto em células P7 como ST1, é possível observar uma banda de aproximadamente 0,5 kpb, que pode corresponder a um fragmento não específico ou, como esta região, de *brm* codifica para o domínio ATPásico, que é muito conservado ao longo da evolução, poderia corresponder a outro cDNA.

Estes fragmentos foram subclonados, em vetor pUC18, como descrito em Material e Métodos, e o DNA plasmideal, das colônias selecionadas, foi utilizado em reações de seqüenciamento. Até agora foram obtidos apenas clones correspondentes à região de 3 a 4,5 kpb, de células ST1. Novas subclonagens foram feitas e seus produtos serão seqüenciados em breve. As seqüências obtidas foram comparadas entre si, para determinação de uma seqüência consenso entre elas e, depois com seqüências do cDNA de *hbrm* depositadas em bancos de dados de domínio público. Na figura 26, é apresentada uma destas análises, representando-se, em vermelho, as regiões que diferem da seqüência humana (preto). Sempre são escolhidas seqüências com boa qualidade, com poucos Ns, para ser possível avaliar se as diferenças entre as seqüências obtidas e a humana, são realmente verídicas e não apenas um

artefato. As seqüências de rato, depositadas em bancos de dados de domínio público, também estão sendo utilizadas na comparação.

Figura 25. RT-PCR para amplificação dos fragmentos do cDNA correspondente a *rbm* de células ST1 e P7. A: Estratégia para amplificação: em azul a representação do cDNA de *hbrm* (usado como padrão) os 3 pares de iniciadores estão indicados em verde, mostrando a amplificação de 3 fragmentos de aproximadamente 1,5 kpb. B: RT-PCR utilizando RNA de células ST1 e P7, onde os números 1, 2 e 3 correspondem aos números que indicam os fragmentos amplificados em A.

```

39   tcctccctacaatcttcaagagttgcagcacatttgagcagtggtttaatgctccgtt 98
    ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2778 tcctcccacaatttttaagagctgcagcacatttgaaacaatgggttcaatgctccatt 2837

99   gccatgaccggcgaaaggggtggacctgaacgaagaagaaccattttgatcatcaggcg 158
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2838 gccatgactggtgaaaggggtgacttaaatgaagaagaacttatattgatcatcaggcg 2897

159  tctacacaaggtggtgagaccctttttactgaggaggctgaagaaagaggttgagtctca 218
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2898 tctacataaggtggttaagaccattttttactaaggagactgaagaaagaagttgaatccca 2957

219  gcttccagaaaaaggttgagtatgtgatcaagtgtgatatgtcagctctgcagaagatcct 278
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2958 gcttcccgaaaaagtggaatatgtgatcaagtgtgacatgtcagctctgcagaagattct 3017

279  gtaccgtcatatgcaggccaagggcatcctcctcacggacgggtctgagaaggataagaa 338
    ||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3018 gtatcgccatatgcaagccaaggggatccttctcacagatgggtctgagaaagataagaa 3077

339  ggggaaaggaggtgccaagacgcttatgaacactatcatgcagctgcgaaagatatgcaa 398
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3078 ggggaaaggaggtgctaagacacttatgaacactattatgcagttgagaaaaatctgcaa 3137

399  ccacccatatatgtttcagcacattgaggaatcctttgctgaacacctgggctattcgaa 458
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3138 ccacccatatatgtttcagcacattgaggaatcctttgctgaacacctaggctattcaaa 3197

459  tgggggtcatcaatggggcgagctgtatcgggcctcacgaaagtttgagctacttgatcg 518
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3198 tgggggtcatcaatggggctgaactgtatcgggcctcagggaagtttgagctgcttgatcg 3257

```

Figura 26. Análise de seqüências consenso dos fragmentos 3-4,5 kpb de *rbrm* comparadas a seqüência humana depositadas em bancos de dado. Em azul a seqüência consenso de *rbrm* obtidas, em preto a seqüência humana.

4.6. Superexpressão de Brm e BRG em células P7

Para avaliar se a resistência da linhagem P7 ao tratamento com Hy seria devido à proteína Brm desta célula não ser ativa, culturas de células P7 foram transfectadas com as construções pSVKS-*hbrm* (P74) e/ou pSVKS-*hBRG1* (P76 e P75, respectivamente) ou com o vetor vazio, pSVKS (P73). Foi feita uma co-transfecção com um marcador genético (pX343), que confere resistência à higromicina. Após seleção com higromicina (3-4 semanas), os clones resistentes foram isolados, conforme descrito em Material e Métodos. Foram isolados, também, clones transfectados apenas com o vetor que confere resistência a higromicina (clones P72). O nome de cada clone, portanto, foi composto dos três algarismos que determinavam com qual construção tinham sido transfectados, seguida de uma letra para especificar cada clone, Ex. O clone P75A, é um clone P7 transfectado com a construção pSVKS-*BRG1*, nome A, algumas vezes será chamado clone 5A, para facilitar.

4.6.1. Análise da expressão de *hbrm* e/ou *hBRG1* nos clones P7 resistentes a higromicina.

Para comprovação da expressão destas construções nos clones isolados, foram desenhados pares de iniciadores que pareavam com uma seqüência presente na região do sítio múltiplo de clonagem do vetor de expressão pSVKS e outro que pareava com seqüência de *hbrm* ou *hBRG1*. Desta forma, por ensaios de RT-PCR, seria possível amplificar, especificamente, o fragmento do cDNA, obtido a partir do RNAm expresso pelas construções pSVKS-*hbrm* (figura 27A) ou pSVKS-*hBRG1* (figura 27B). Neste ensaio, até agora, pudemos comprovar a expressão destas construções nos clones 4A e 6D (figura 27), 4F e 6D (dados não apresentados). As reações não se apresentam muito uniformes, sendo que os clones positivos em uma reação nem sempre são positivos em outra, devendo ser melhorada a técnica empregada nesta reação. Uma banda de aproximadamente 800 pb aparece nas reações utilizando-se iniciadores para amplificação de fragmento de pSVKS-*hBRG1*, somente nos canais correspondentes a clones que foram transfectados com o vetor contendo um inserto (5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 6C e 6D), o que mais provavelmente é um artefato.

Foram feitos, também, alguns ensaios de Western blot, para analisar a expressão das proteínas exógenas. Porém, como não temos anticorpo específico para as proteínas humanas, utilizamos um anticorpo que reconhece ambas, ou seja, a humana (exógena) e murina (endógena). Para tentar avaliar a expressão, foram utilizadas duas concentrações diferentes de extrato protéico. Sabendo-se que a proteína endógena somente é reconhecida em concentração acima de 130µg de extrato protéico total, utilizamos extratos de 70 e 140µg. Desta forma, nas células que não estivessem expressando a proteína exógena, o anticorpo seria capaz de reconhecer a proteína BRG ou Brm somente em 140µg de extrato protéico, enquanto nas células que expressassem a proteína exógena, esta seria reconhecida em 70µg de extratos. Os clones 6A, 6E, 6F e 5B (figura 28A), parecem estar expressando a proteína hBRG1, pois o anticorpo (anti-BRG1, Santa Cruz, específico para BRG1) foi capaz de reconhecer a proteína mesmo nos canais em que a concentração da mesma era de 70µg. O mesmo não é observado nos canais onde foram aplicados lisados de clones transfectados com o vetor vazio (figura 28A, clone 3A) e no canal correspondente ao clone que deveria superexpressar hBrm (figura 28A, clone 4B).

No caso dos clones que deveriam superexpressar a proteína hBrm, foram feitos os mesmo ensaios, utilizando o anti-Brg, produzido no laboratório, o qual é capaz de reconhecer a proteína Brm. Também neste caso, somente em clones transfectados com pSVKS-hbrm houve reconhecimento da proteína em canais onde foram aplicadas apenas 70µg de proteína total. Na figura 28B, é apresentado o resultado obtido para o clone 4B, sendo que, como controle negativo, foram utilizados clones pSVKS (3B) e clones contendo somente o vetor que confere resistência à higromicina (2A). Estes ensaios foram feitos para outros clones, 5A, 5C, 6B e 4C (dados não apresentados) mostrando que estes clones estão expressando a proteína exógena.

4.6.2. Análise dos efeitos da superexpressão do gene *hBrm* em células P7

A transfecção das células P7 com a construção pSVKS-*hbrm* induziu uma alteração morfológica nestas células, o mesmo não sendo observado nos clones transfectados com o vetor vazio ou com o plasmídeo que confere resistência à higromicina. Na figura 29, onde são mostrados os clones P74 (transfectante de pSVKS-*hbrm*), P73E (transfectante de pSVKS) e P72E (transfectado somente com pX343), é possível observar a alteração morfológica dos clones P74, quando comparados com 3E e 2E. A transfecção com *hbrm* causou um achatamento celular e as células passam a formar monocamada, além de se apresentarem um pouco maiores que nos controles (3E e 2E).

Células em cultura são classificadas como normais ou transformadas dependendo de características específicas morfológicas e de crescimento. Algumas destas características foram analisadas por técnicas já estabelecidas de cultura. Foram feitas curvas de crescimento para avaliar se a superexpressão exógena de *hBrm* causaria mudanças na taxa proliferativa destes clones e os clones foram mantidos na presença ou na ausência de Hy, para avaliação da resposta a este hormônio nos clones transfectados, sabendo-se que células P7 são insensíveis ao tratamento. Foi analisada a eficiência de formação de colônias em suspensão de agarose ou substrato sólido. Nestes experimentos, cada clone celular foi plaqueado em baixa densidade e as colônias macroscópicas formadas, foram contadas após 15 ou 20 dias em cultura.

Nos ensaios de curva de crescimento pudemos verificar que a superexpressão de *hBrm* leva a uma diminuição na taxa de crescimento dos clones P74 (figura 30, em vermelho), quando comparados a clones que possuem o vetor vazio (figura 30, em azul).

Figura 29. Morfotipo celular dos clones P7 transfectantes de pSVKS-hbrm. Clones mantidos em meio DME 5% SBF, em confluência. As fotos foram obtidas em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento 100X).

Figura 30. Perfil do crescimento dos clones P74 na presença e na ausência de tratamento com Hy. O mesmo número de células (4×10^4 cél/placa) de cada clone celular foi plaqueado e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). Duplicatas de cada condição foram coletadas por tripsinização, nos períodos indicados e contadas com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM.

O clone P74F, que apresenta uma taxa de crescimento mais semelhante a dos clones controle, responde ao tratamento com Hy, com uma diminuição significativa ($p < 0,001$) em sua taxa de crescimento (figura 31). Este clone, também apresenta um aumento do tempo de dobramento e diminuição de sua densidade de saturação (tabela 4). Ainda com relação à figura 31, a curva de crescimento obtida para células ST1, mostra uma alta resposta ao tratamento com Hy. Este mesmo tratamento não afeta o crescimento, tempo de dobramento e densidade de saturação dos demais clones, apenas o clone

controle P73E, parece ter sua densidade de saturação aumentada pelo tratamento, de maneira estatisticamente significativa (tabela 4).

A

B

Figura 31. Curva de crescimento do clone P74F e de células ST1. O mesmo número de células (4×10^4 cél/placa) de cada linhagem foi plaqueado e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100ng/ml). Duplicatas de cada condição foram coletadas, por tripisnização, nos tempos indicados e contadas com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os dois pontos.

Tabela 4: Comparação dos tempos de dobramento e densidade de saturação dos diferentes clones transfectantes de hBrm (P74) e controle (P73).

Clone Celular	Tempo de dobramento (horas)*		Densidade de saturação (nº de céls x 10 ⁵ /cm ² **)	
	-	Hy	-	Hy
P73E	36	40	2,0*	2,8*
P73F	43,7	39,2	1,4	1,9
P74A	61,1	56,4	1,7	1,4
P74B	54,4	62,4	1,0	1,2
P74C	55,8	56,0	1,9	1,8
P74E	52,7	57,6	0,8	0,9
P74F	36,4*	42,9*	2,4*	1,6*

* Calculado entre o terceiro e o quinto dia de crescimento

** Média do número de células por cm².

* Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05), na ausência e na presença de Hy

As colônias que se desenvolveram no ensaio de crescimento em substrato sólido, foram classificadas de acordo com o tamanho em: Grandes (maiores que 0,5 cm); Médias (entre 0,5 e 0,2 cm) e Pequenas (menores que 0,2 cm). Após contagem e classificação, das colônias, verificou-se que houve uma diminuição acentuada do número de colônias Grandes nos clones P74 (figura 32), quando comparadas aos controles de clones transfectados com vetor vazio (3E e 3F) ou pX343 (2E e 2D). O clone P74F apresenta um número alto de colônias Grandes que é muito semelhante àqueles de clones controles, porém, como observado para a curva de crescimento, parece responder ao tratamento com

Hy, com uma pequena diminuição do número de colônias Grandes. O número de colônias Médias ou Pequenas não foi afetado nestes clones.

Figura 32. Número colônias grandes formadas em substrato sólido, pelos clones P74. O mesmo número de células (2×10^2 cél/placa) de cada linhagem foi plaqueado e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). Após 15 dias, as células foram fixadas e coradas e triplicatas de cada condição foram analisadas.

Em experimento de formação de colônia em substrato semi-sólido, estes clones apresentaram, de um modo geral, diminuição no número e tamanho das colônias formadas, quando comparados aos controles (tabela 5). Neste ensaio, o clone P74F, apesar de apresentar um número alto de colônias, mostrou uma diminuição no número de colônias formadas, após tratamento com Hy, quando comparado ao controle contendo P73E, (Figura 33).

Tabela 5: Comparação do número de colônias formadas em substrato semi-sólido, entre os diferentes clones transfectantes de hBrm (P74), hBRG1 (P75) e ambos (P76), e os controles transfectantes de pSVKS (P73) e pX343 (P72).

Clone Celular	Número de colônias formadas	
	-	Hy
P72B	152	276
P72E	465	475
P73F	105	103
P74C	43	58
P74D	108	98
P74F	312*	162*
P75B	58	73,7
P75E	7	18
P75F	92,2	98
P76A	16	22,7
P76F	15,7*	5*

* Diferenças entre os dois estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

* Teste T de Student $p < 0,01$)

Figura 33. Diminuição do número de colônias formadas em substrato semi-sólido pelo clone P74F, após tratamento com Hy. O mesmo número de células (2×10^4 cél/placa) de cada linhagem foi plaqueado e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). Após 20 dias, as células foram fixadas e contadas com o auxílio em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento 100X).

4.6.3. Análise dos efeitos da superexpressão do gene *hBRG1* em células P7

A transfecção das células P7, com a construção pSVKS-*hBRG1*, também foi capaz de induzir mudanças morfológicas nestas células, quando comparadas aos clones transfectados com o vetor vazio (P73) ou com o plasmídeo que confere resistência a higromicina (P72). Na figura 34, são mostrados os clones P75 (transfectantes de pSVKS-*hBRG1*), clones P73F e clones P72D. Nesta figura, é possível observar que a transfecção causa diferença morfológica nos clones P75, quando comparados aos clones 3F e 2D, porém não tão drásticas como aquelas apresentadas pelos clones P74 (figura 29), apresentando variação maior do fenótipo. Alguns clones, como P75E e 5B (figura 34) apresentam um morfotipo semelhante àquela observada para os clones P74 (figura 29), com achatamento celular e crescimento em monocamada. Outros clones, como P75A e 5C (figura 34), apesar de apresentarem achatamento celular e tendência a crescimento em monocamada, quando comparados aos controles, clones 3F e 2D, não apresentam uma mudança tão evidente como os clones P74.

Os clones P75 (figura 35 em vermelho) apresentam uma tendência de diminuição na taxa de crescimento, de um modo geral mais acentuada do que os clones P74 (figura 30), quando comparados aos controles (P73, em preto). Esta diminuição é mais acentuada nos clones P75E e 5F (figura 35). O tratamento com Hy, também não parece afetar seu crescimento, densidade de saturação e o tempo de dobramento (tabela 6). Apesar do aumento do tempo de dobramento dos clones P75E e P75F (Tabela 6), e da densidade de saturação de outros clones, estes dados não foram considerados estatisticamente significativos pelo teste T de Student ($p > 0,05$).

Figura 35. Perfil do crescimento dos clones P75 na presença e na ausência de tratamento com Hy. O mesmo número de células (4×10^4 céls/placa) de cada clone celular foi plaqueado e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). Duplicatas de cada condição foram coletadas por tripisinização, nos tempos indicados, e contadas com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM.

O mesmo critério de tamanho de colônias formadas em substrato sólido, foi utilizado para os clones P75. Neste ensaio verificou-se uma diminuição do número de colônias Grandes na maioria dos clones P75, quando comparados aos controles P73 e P72 (figura 36), independente do tratamento com Hy. Somente o clone P75A apresenta um número de colônias semelhante aos controles P73 e P72 (figura 36), porém, este não apresenta resposta ao tratamento com Hy. O número de colônias médias e pequenas só foi afetado nos clones P75C e 5E, não sendo afetado nos outros clones (figura 36).

Tabela 6: Comparação dos tempos de dobramento e densidade de saturação dos diferentes clones transfectantes de hBRG1 (P75) e controle (P73).

Clone Celular	Tempo de dobramento (horas)*		Densidade de saturação (nº de céls x 10 ⁵ /cm ² **)	
	-	Hy	-	Hy
P73E	36	40	2,0*	2,8*
P73F	43,7	39,2	1,4	2,0
P75A	45,1	26,8	1,5	1,8
P75B	46,0	39,5	1,4	1,7
P75C	51,3	40,1	1,1	1,3
P75E	26,6	41,1	1,2	2,1
P75F	30,8	50,0	0,8	1,4

* Calculado entre o terceiro e o quinto dia de crescimento.

** Média do número de células por cm².

* Diferenças estatisticamente significativas (p<0,05), na ausência e na presença de Hy

Nos ensaios de crescimento em substrato semi-sólido os clones P75B e P75E apresentaram diminuição da capacidade de formar de colônias, quando comparados aos controles (Tabela 5). No caso do clone P75F houve uma diminuição do número de colônias, porém quando comparado ao clone P73F, esta diferença não é significativa (tabela 5).

Figura 36: Número de colônias formadas em substrato sólido, pelos clones P75. O mesmo número de células (2×10^2 cél/placa) de cada linhagem foi plaqueado e as culturas mantidas foram mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). Após 15 dias, as culturas foram fixadas e coradas e triplicatas de cada condição foram analisadas.

4.6.4. Análise dos efeitos da superexpressão simultânea dos genes *hBrm* e *hBRG1* em células P7

Os clones P76, transfectados com ambas as construções (pSVKS-*hbrm* e pSVKS-*hBRG1*), apresentaram uma alteração morfológica dramática, quando comparados aos controles (figura 37). Estes transfectantes duplos apresentam um grande achatamento celular, crescendo em monocamada, e apresentam células maiores (mais espalhadas) do que as culturas controle (figura 37).

Os ensaios de curva de crescimento mostraram que estes clones, série P76 (figura 38A, em vermelho), apresentam uma baixa taxa de crescimento, quando comparados aos clones controle 3E e 3D (figura 38A, em preto). Os clones 6F e 6B apresentam uma taxa de crescimento muito baixa (figura 38A), mesmo quando comparados com os outros clones P76, assim como com clones P74 e P75, sendo difícil conseguir culturas confluentes destes clones (figura 37). Apresentando uma densidade de saturação baixa e elevação do tempo de dobramento, o que parece aumentar quando tratados com Hy (tabela 7).

Os clones P76A e 6E apresentam uma taxa de crescimento semelhante ao dos controles, assim como tempo de dobramento e densidade de saturação (tabela 7), porém o clone 6E apresenta uma pequena diminuição deste crescimento quando tratado com Hy (em destaque na figura 38B), e aumento no tempo de dobramento, juntamente com diminuição da densidade de saturação (tabela 7) apresentando mudanças morfológicas após estes tratamento, como um maior achatamento celular (figura 39).

clone 2: pX343; clone 3: pSVKS; clones 6: pSVKS-hbrm e hBRG1

Figura 37. Morfotipo celular dos clones P7 transfectantes de pSVKS-hBRG1 e hbrm. Clones mantidos em meio DME 5% SBF, em confluência. As fotos foram obtidas em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento 100X).

A

B

* Teste T de Student $p < 0,001$)

Figura 38: Perfil do crescimento dos clones P76 na presença e na ausência do tratamento com Hy. O mesmo número de células (4×10^4 céls/placa) de cada clone celular foi plaqueado e as culturas foram mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). A: clones P76 e P73; B: curva do clone P76E em destaque. Duplicatas de cada condição foram coletadas por tripsinização, nos tempos indicados e contadas com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM.

Tabela 7: Comparação dos tempos de dobramento e densidade de saturação dos diferentes clones transfectantes de hBRG1 e hBrm (P76) e controle (P73) e células ST1.

Clone Celular	Tempo de dobramento (horas)*		Densidade de saturação (nº de céls x 10 ⁵ /cm ² **)	
	-	Hy	-	Hy
P73E	36	40	2,0*	2,8*
P73F	43,7	39,2	1,4	1,9
P76A	33,1	32,4	1,8	1,8
P76B	50,1	58,4	0,8*	1,0*
P76E	30,1	38,0	3,6**	2,4**
P76F	25,9	50,7*	1,2*	1,8*
ST1	16,4	31,8*	15,8**	2,7**

* Calculado entre o terceiro e o quinto dia de crescimento

** Média do número de células por cm².

Diferenças estatisticamente significativas: * p<0,05 ** p<0,01, na ausência e na presença de Hy

O número de formação de colônias em substrato sólido cai drasticamente para a maioria dos clones (figura 40), quando comparados aos controles (clones P73 e P72) tanto em colônias grandes (clones 6B, E e F), como médias (clones 6B, E e F) e pequenas (clones 6B e E), não estando esta diminuição ligada ao tratamento com Hy (figura 40). O clone P76A não apresenta diminuição do número de colônias, como visto para os outros clones P76, porém é o único clone que apresenta uma resposta ao tratamento com Hy, apresentando diminuição do número de colônias grandes após este tratamento (figura 40).

Controle

Hy
(100ng/ml)

Figura 39. Efeito do tratamento com Hy na morfotipia do clone celular P76E. O mesmo número de células (4×10^4 cél/placa) foi plaqueado em duplicatas e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB com ou sem Hy (100 ng/ml). Fotos tiradas após 8 dias em cultura, com auxílio de um microscópio Nikon Diaphot invertido, sob contraste de fase, e aumento 100X..

Figura 40: Número de colônias formadas em substrato sólido pelos clones P76. O mesmo número de células (2×10^2 cél/placa) de cada linhagem foi plaqueado e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). Após 15 dias as células foram fixadas e coradas e triplicatas de cada condição foram analisadas.

Em experimento de formação de colônia em substrato semi-sólido, os clones P76B e P76E não foram capazes de formar colônias. Os clones P76A e P76F foram capazes de formar colônias, porém em número muito menor, quando comparados aos controles (tabela 5). Ainda neste ensaio, o clone P76F, apresentou uma diminuição no número de colônias formadas, após tratamento com Hy (Figura 41, tabela 5).

* Teste T de Student $p < 0,01$)

Figura 41. Diminuição do número de colônias formadas em substrato semi-sólido pelo clone P76F, após tratamento com Hy. O mesmo número de células (2×10^4 cél/placa) de cada linhagem foi plaqueado e as culturas mantidas em meio DMEM 5% SFB na presença e na ausência de Hy (100 ng/ml). Após 20 dias, as células foram fixadas e contadas com o auxílio em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento 100X).

5.1. Produção e Caracterização de anticorpo contra Brm e BRG1

5.1.1. Produção e purificação de proteína recombinante Trx-Brg.

A produção de anti-soros policlonais exige além de uma alta quantidade da proteína, a ser utilizada como antígeno, que esta se apresente com um certo grau de pureza. Como o interesse na produção da proteína BRG1 recombinante é sua utilização na inoculação de coelhos para geração de anti-soro policlonal, optamos pela utilização do sistema de expressão bacteriano pET (Novagen, Inc.). Uma grande vantagem deste sistema é que possui seqüências adjacentes ao sítio de clonagem que codificam para peptídeos-caudas (His•Tag® e S•Tag®), as quais aumentam a solubilidade da proteína de fusão, facilitando sua purificação e detecção imunológica. A proteína recombinante é expressa em fusão com a tiorredoxina, a qual proporciona o aumento da solubilidade no citoplasma de *E. coli.*, podendo ser purificada na sua forma solúvel, sem comprometimento de sua conformação. Outra vantagem, para a obtenção de anti-soro em animais, é que proteínas de fusão podem aumentar a imunogenicidade da proteína de interesse.

Para obtermos a proteína de interesse em alta quantidade e com bom nível de purificação, foram feitos estudos de otimização dos processos de geração e purificação da proteína de fusão. Um problema apresentado na purificação era que a maior parte da proteína permanecia junto ao material insolúvel. Como a proteína Trx aumenta a solubilidade da mesma no citoplasma de *E. coli.*, era mais provável que este problema fosse devido à uma baixa eficiência de lise por sonicação, portanto, passou-se a usar lisozima para melhorar a lise. Outro problema, na purificação, era de que havia uma baixa eficiência da ligação da proteína com a resina, portanto, passou-se a fazer mais de um ciclo de incubação com a resina. Através de ensaios para melhorar a purificação, foi possível encontrar uma concentração de Imidazol mais eficiente para a lavagem da resina, de forma que não haveria perda da proteína de interesse, porém, a maior parte de proteínas contaminantes seriam lavadas. Uma eluição eficiente da proteína de fusão da resina é outro fator importante para melhor purificação da mesma, Pompéia (1996) descreve uma grande

perda de rendimento na purificação de proteínas em fusão com GST, devido à eluição ineficiente da mesma.

Ao longo destes testes esperava-se encontrar maior rendimento da produção da proteína Trx-Brg, porém o rendimento passou a cair, como pode ser visto na tabela 2. As duas primeiras produções apresentavam um bom rendimento, porém a 3ª e a 4ª um baixo rendimento. Este problema parece estar ligado ao fato do clone de bactéria utilizado para estas 4 produções ser o mesmo, isto é, as bactérias foram crescidas de estoque congelado. Sabe-se que há uma diminuição de eficiência na expressão protéica após algum tempo de utilização do mesmo clone, pois, uma instabilidade genética decorrente da grande força dos promotores, leva à seleção de bactérias que não expressam os genes de interesse. Portanto, a diminuição do rendimento protéico não estava relacionada a problemas com a purificação. Foi feita uma nova transformação, 8 clones foram testados quanto à expressão da proteína recombinante e a produção voltou aos níveis apresentados anteriormente (tabela 1, 5ª produção). Ainda assim, este rendimento é baixo, se compararmos, por exemplo, com o rendimento obtido para a proteína Trx sozinha (tabela 1). Pompéia (1996) observou que a purificação da proteína GST (no sistema pGEX de expressão em bactérias) apresenta uma purificação alta (quase 90%), embora em fusão com outra proteína tal grau de purificação diminuía demasiadamente (Pompéia *et al*, 1996). Desta forma, já era esperado que a proteína Trx sozinha tivesse um maior grau de purificação, apesar de, neste caso a purificação da proteína Trx apresentar os mesmos problemas de perda da proteína no material insolúvel, no solúvel e nas lavagens, encontrados na purificação da proteína Trx-Brg (dados não apresentados). Sendo assim, a diferença no rendimento encontrado para a proteína Trx sozinha também está relacionada a menor eficiência de expressão, o que é comum, pois a proteína Trx-Brg é bem maior que a Trx, o que pode dificultar a sua expressão na bactéria. Além disso, devem ser levados em conta fatores como uma possível toxicidade da proteína recombinante.

O rendimento médio obtido com proteínas do sistema pET é de 1 a 10mg/l, tendo sido descritos rendimentos de, no máximo, 30mg/l, sendo assim o rendimento obtido para Trx-Brg está próximo do esperado (vide tabela 2).

5.1.2. Caracterização de anti-soro policlonal anti-Brg.

Uma vez produzida e purificada, a proteína recombinante foi inoculada em animal para geração de anticorpo. A escolha de coelhos para a geração de anti-soros se deve à possibilidade de gerar um grande volume dos mesmos. A dose inicial utilizada foi de 200µg de proteína recombinante, conforme especificações de manuais de laboratório, que aconselham de 0,05-2mg (Harlow & Lane, 1988; Sambrook *et al*, 1989 e Ausubel *et al*, 2002). A dose inoculada é muito importante, pois doses muito altas ou muito baixas podem gerar tolerância ou ausência de resposta imune no animal (Sambrook *et al*, 1989 e Abbas *et al*, 1994). A via de inoculação escolhida foi a intramuscular (fácil de ser realizada e com velocidade moderada de liberação do antígeno) e via subcutânea. De um modo geral as coletas apresentaram-se pouco ou não hemolisadas, tanto de soro pré-imune como de imune, demonstrando que o método de extração do soro foi adequado. A hemólise leva à liberação de componentes celulares, entre os quais as proteases, que podem degradar o anticorpo, portanto a obtenção de anti-soro pouco ou não hemolisado contribui para melhor qualidade do anti-soro.

As quatro coletas obtidas nesta imunização tiveram sua reatividade contra a proteína Trx-Brg, testada em ensaios de Western blot. O anti-soro foi capaz de reconhecer a proteína recombinante Trx-Brg nestes ensaios. Foi verificado que o título do anti-soro teve um aumento ao longo das coletas, pois passou a reconhecer a proteína de interesse mais fortemente, passando também a apresentar reatividade contra outras proteínas bacterianas. Cada coleta pode apresentar variação quanto ao título. Sabe-se que há um aumento do título ao longo da imunização, seja por um aumento da concentração dos anticorpos ou da sua afinidade, ou ambos.

Como a finalidade da produção deste anti-soro era sua utilização para estudo de proteínas celulares em mamíferos, passamos a caracterizar sua reatividade contra a proteína BRG1 celular. A reatividade do anti-soro obtido na primeira coleta foi testada, utilizando extratos totais de proteínas de célula HeLa, linhagem celular humana que expressa tanto hBRG1 como hBrm (Khavari *et al*, 1993, Muchadt *et al*, 1996 e Wang *et al*, 1996a), em ensaios de

Western blot. O anti-soro da primeira coleta foi capaz de reconhecer uma proteína de 200 kDa, provavelmente hBRG1, em lisados de células Hela, porém não em extratos protéicos de células ST1 (de rato). Como o anti-soro foi produzido a partir de uma proteína recombinante com fragmento da proteína hBRG1 humana (indicado na figura 42), é esperado que tenha uma reatividade maior contra a proteína humana. Espera-se, porém, que seja capaz de reconhecer os homólogos desta proteína em outras espécies, ainda que não com a mesma afinidade que para a proteína humana, por ser uma proteína muito conservada ao longo da evolução (figura 3), tendo homólogos, entre outros, em levedura (Ster *et al*, 1984 e Peterson & Herkowitz, 1992), *Drosophila* (Tankum *et al*, 1992) e camundongo (Randanzzo *et al*, 1994). Utilizando um fragmento do gene *BRG1* humano (3829-4250pb), Gelius *et al* (1999) descreveram a produção de um anti-soro anti-(rat-BRG1). Este fragmento apresenta 90% de homologia em sua seqüência nucleotídica com a mesma região do gene *BRG1* de rato e uma identidade de 98,5% entre as proteínas das duas espécies. O fragmento do gene *BRG1* humano (3317-4849pb), utilizado no presente trabalho para a produção do anti-soro, abrange a mesma região utilizada por Gelius *et al*.. Desta forma, a falta de reconhecimento da proteína homóloga de rato em lisados de células ST1, deve ser devida a uma baixa concentração do anti-soro, e não ao fato deste não ser capaz de reconhecer a proteína de rato. Como a produção deste anti-soro visa, principalmente, sua utilização no estudo de células ST1 e P7, foram testadas as 3ª e 4ª coletas, que apresentam um título maior em ensaios de Western blot, com a proteína recombinante.

A proteína BRG1 humana apresenta aproximadamente 200 kDa (Khavari *et al*, 1993), assim como sua homóloga em rato (Östlund *et al*, 1997 e Gelius *et al*, 1999), enquanto para Brm, o tamanho esperado é de aproximadamente 190 kDa. Tanto o anti-soro da 3ª como da 4ª coleta mostraram ser capazes de reconhecer uma proteína de aproximadamente 190 kDa, que deve corresponder à proteína Brm, tanto em células HeLa como em ST1. Pois, além desta proteína apresentar aproximadamente 190 kDa, outra característica que

indica que ela seja rBrm e não rBRG1 é porque, nas células ST1, esta proteína acumula-se após o tratamento prolongado com Hy (24h), tratamento este que leva a uma parada destas células na fase G1 do ciclo. Foi descrito que a proteína Brm é acumulada nesta circunstância, enquanto a proteína BRG1 não sofre alterações (Muchardt *et al*, 1996). Este resultado não é totalmente inesperado, pois essas duas proteínas (BRG1 e Brm) possuem uma alta identidade entre si (figura 42), sendo que os dois primeiros anti-soros produzidos, contra BRG1 e Brm, também apresentavam reatividade cruzada entre si (Khavari *et al*, 1993 e Muchardt & Yaniv, 1993). Apesar da região escolhida para produção da proteína utilizada, na obtenção do anti-soro anti-Brg, ser uma região de menor identidade entre BRG1 e hBrm (figura 42, região em vermelho), ainda assim, apresenta 68% de identidade com hBrm e uma região, ainda que pequena, com 86% de identidade. Para a produção do anti-(rato-BRG) (Gelius *et al*, 1999) foi utilizada esta mesma região de hBRG1, porém a proteína de fusão utilizada neste trabalho não possuía a região que apresenta 86% de identidade com hBrm. Este anti-soro, anti-(rato-BRG), não apresentou reatividade cruzada com a proteína Brm, portanto, a região de 86% de identidade parece ser a principal responsável pela reação cruzada do nosso anti-soro. Esta região, apontada em vermelho na figura 42, também apresenta o Bromodomínio, o qual é altamente conservado entre Brm e BRG1.

Vale lembrar que a experiência de outros laboratórios (R. Bravo, comunicação pessoal) indica que apesar de uma primeira coleta de anti-soros ser específica para o antígeno-inóculo, pode ocorrer um aumento da reatividade cruzada do anti-soro contra membros de uma mesma família gênica, nas outras coletas, o que explicaria porque o anti-soro da primeira coleta reconheceu somente a proteína hBRG1, em ensaios de Western blot e não a proteína hBrm, em células HeLa, enquanto os da 3ª e 4ª coletas reconhecem com mais avidéz a proteína hBrm.

Figura 42. Identidade entre as regiões das proteínas hBrm e hBRG1. 52%, região amino-terminal de Brm (aas 1-322) e hBRG-1 (aas 1-346); 86%, região central de hBrm (aas 323-1221) e hBRG1 (347-1251) e 68%, região C-terminal de hBrm (1222-1572) e hBRG1 (1252-1647). A região pintada de vermelho, na proteína hBRG1, corresponde à região (aminoácidos 1105 a 1616) utilizada para expressão da proteína recombinante Trx-Brg, a qual foi usada para produção do anti-soro anti-Brg (Modificado de Chiba *et al*, 1994). Bromodomínio em amarelo e Motivo de Helicase em azul.

Como os anti-soros da 3ª e da 4ª coletas eram capazes de reconhecer outras proteínas bacterianas, além da proteína recombinante de interesse (vide figura 13), foi importante caracterizar se os anticorpos que possuíam reatividade contra a proteína celular são os mesmos que apresentam reatividade contra a proteína Trx-Brg, o que também ajudaria a provar a identidade da proteína celular. O anti-soro pré-incubado com a proteína Trx-Brg (imobilizada em uma membrana) perdeu completamente a reatividade contra a proteína celular (de células HeLa) e apresentou uma diminuição em sua reatividade com a proteína recombinante, mostrando que os anticorpos que apresentam reatividade contra a proteína celular são os mesmos que reconhecem a proteína Trx-Brg. O anti-soro apresenta uma alta reatividade contra a proteína recombinante, sendo necessário uma grande quantidade da

proteína Trx-Brg para retirar totalmente estes anticorpos do anti-soro, não sendo inesperado que mesmo após a pré-adsorção, este anti-soro ainda apresente anticorpos capazes de reconhecer a proteína recombinante.

Um ensaio de imunoprecipitação foi utilizado, também, para comprovar que as proteínas reconhecidas por anti-Brg realmente corresponderiam às proteínas hBRG1 ou hBrm. O reconhecimento de uma proteína de 190 kDa e de uma de 200 kDa em células A31 (fibroblasto de camundongo) quiescentes e tratadas com soro por 2h, apresentou o resultado esperado, já que a proteína mBrm (Brm de camundongo) é acumulada no núcleo de fibroblasto quiescentes e degradada após 10 h de estímulo com soro, mas o mesmo tratamento não afeta a concentração de mBRG1 (Muchardt *et al*, 1998). A proteína de 190 kDa não é observada em células B61 (células A31 transformadas com EJ-*ras*) (Kovary *et al*, 1989), sendo encontrada somente a banda correspondente à proteína BRG1. A transformação pelo oncogene *ras* leva à perda da expressão da proteína mBrm nesta linhagem (Muchardt *et al*, 1998), já a proteína mBRG (BRG de camundongo) não tem sua expressão alterada nos dois casos. Deste modo, a identidade das proteínas reconhecidas por este anti-soro foi comprovada. A transformação celular pelo antígeno viral MT, também leva a diminuição da expressão de Brm, assim, ensaios de Western blot, utilizando células transformadas por MT, também serviram para comprovar a identidade da proteína reconhecida pelo nosso anti-soro.

Alguns anti-soros reconhecem a proteína de interesse apenas se esta estiver em sua conformação nativa, outros atuam melhor se a proteína estiver em uma forma desnaturada, pois a conformação assumida pela proteína nativa pode estar escondendo os sítios de reconhecimento pelo anticorpo. Além disso, a ligação de outras proteínas à proteína de interesse pode, também, encobrir esta região. Como um dos interesses da utilização deste anticorpo era poder co-imunoprecipitar proteínas que estejam ligadas às proteínas BRG ou Brm, era interessante que o nosso anti-soro pudesse reconhecer a proteína em sua conformação nativa, na qual uma possível ligação interprotéica estaria mantida. Este anticorpo mostrou-se capaz de funcionar em ensaios de IP utilizando-se lisados não desnaturantes, o que foi primeiramente testado em

células HeLa (figura 18). Neste experimento, foi possível verificar, também, que outras proteínas foram imunoprecipitadas (diretamente pelo anticorpo) ou co-imunoprecipitadas (por estarem ligadas a hBRG1 ou hBrm), pelo aparecimento de outras bandas, como por exemplo, uma banda de aproximadamente 100 kDa, que poderia corresponder tanto à proteína pRb como a outra proteína que se associe a BRG ou Brm, como por exemplo, BAF 110 kDa (Wang *et al*, 1996a), mostrando que o anti-soro poderia ser utilizado para ensaios de co-imunoprecipitação.

5.2. Estudo da composição dos complexos formados por Brm e BRG1 em células ST1 e P7.

O sucesso na utilização de anti-Brg em ensaios de imunoprecipitação, garante uma ferramenta muito importante para o estudo da ação destas proteínas no controle do ciclo celular, tanto em nosso modelo de glioma de rato, como em outros modelos celulares. Assim, torna-se possível estudar não só a expressão das proteínas Brm e BRG em determinadas condições fisiológicas, mas também, sua interação física com outras proteínas, através de ensaios de co-imunoprecipitação. As proteínas Brm e BRG1 fazem parte de um complexo multiprotéico, assim como sua homóloga em *Saccharomyces cerevisiae* (SWI2/SNF2) (Ster *et al*, 1984 e Peterson & Herkowitz, 1992), com atividade de desestruturação de nucleossomos, em mamífero (Kwon *et al*, 1994; Wang *et al*, 1996b e Östlund *et al*, 1997), tendo um importante papel na liberação de regiões específicas do DNA para transcrição gênica. Este complexo pode apresentar uma composição variada de proteínas (Wang *et al*, 1996a e b; Dallas *et al*, 1998 e de La Serna *et al*, 2000), o que está relacionado com uma função transcricional específica (Kadam *et al*, 2000). Mesmo Brm e BRG são intercambiáveis e a presença de um ou de outro no complexo parece fazer com que este exerça diferentes funções (Aalfs *et al*, 2001). A caracterização deste complexo, portanto, é muito importante para a determinação de sua função transcricional. A utilização de ensaios de imunoprecipitação das proteínas BRG1 ou Brm levou ao isolamento de proteínas associadas, como as chamadas BAFs ("BRG associated factors")

(Wang *et al*, 1996a), as quais fazem parte deste complexo multiprotéico. Também através de ensaios de co-imunoprecipitação, foram identificadas, dentro deste complexo, algumas proteínas homólogas em mamífero, de proteínas presentes no complexo multiprotéico de *Saccharomyces cerevisiae* como por exemplo hSNF5 (Muchardt *et al*, 1995). Muitas proteínas, conhecidas por exercerem papéis importantes na regulação do ciclo celular, são capazes de interagir fisicamente com este complexo multiprotéico, ou com suas proteínas componentes. Por exemplo, pode-se citar a proteína p300/CREB (Dallas *et al*, 1998); GR (Östlund Farrants *et al*, 1997 e Fryer and Archer, 1998) e pRb ou proteínas da família (Dunaief *et al*, 1994; Singh *et al*, 1995; Strober *et al*, 1996; Trouche *et al*, 1997, Dahiya *et al*, 2000; Strobeck *et al*, 2000 e Zhang *et al*, 2000) e c-Myc (Cheng *et al*, 1999).

Os ensaios de imunoprecipitação realizados com o anti-Brg, em células ST1 e P7, mostraram que há uma diferença entre as linhagens P7 e ST1 na composição das proteínas co-imunoprecipitadas, com BRG1 ou Brm. Uma destas proteínas é a de aproximadamente 160 kDa (vide figura 20), a qual têm sua intensidade aumentada em células ST1 tratadas com Hy, porém só está presente, e muito fortemente, em células P7 não tratadas. Recentemente foi descrito que Brm é clivada em sua porção terminal, gerando uma proteína de 160 kDa, em células apoptóticas (Biggs *et al*, 2001); portanto, a proteína observada neste experimento poderia ser uma forma clivada de Brm. Esta clivagem leva à posterior degradação da proteína, porém, em ensaios de Western blot (vide figuras 15, 22 e 23), podemos constatar que a proteína Brm sofre um acúmulo em células ST1 tratadas com Hy, além disso, estas células não se tornam apoptóticas, após este tratamento (Mercado, 1997). Outra hipótese é de que esta proteína poderia corresponder à BAF155 ("BRG/Brm associated factor" 155), proteína de aproximadamente 155 kDa, que faz parte do complexo SWI/SNF em mamífero (Wang *et al*, 1996a), ou alguma outra proteína que também pode fazer parte ou estar associada ao complexo.

Outra proteína co-imunoprecipitada nestes ensaios, é uma de aproximadamente 108 kDa (vide figura 20), que poderia corresponder à pRb. O aparecimento desta banda pode ou não estar sendo condicionado à presença

de Hy, nas células ST1, uma vez que esta banda está em uma região do gel onde existe alto "background", dificultando a comparação de sua intensidade, esta banda é também observada nos lisados de células P7. Experimentos de imunoprecipitação com lisados de células ST1 e P7 tratadas com Hy, usando anticorpo contra a proteína pRb, mostrara a co-imunoprecipitação de uma proteína de aproximadamente 180 kDa (Armelin et al, 1996 e Mercado, 1997). Esta proteína tem seu aparecimento induzido pelo tratamento hormonal nas células ST1, porém não nas células P7 (Armelin et al, 1996 e Mercado, 1997), tendo sido proposto que esta proteína seria rBrm. Para comprovar a identidade desta banda, foram feitos ensaios de imunoprecipitação, utilizando anti-Rb, seguido de um Western blot (vide figura 21), utilizando-se o anti-soro anti-BRG, porém não foi possível reproduzir os resultados obtidos por Mercado (1997), muito provavelmente devido ao anticorpo anti-Rb utilizado ser de um lote diferente. Como discutido em 4.2., um anticorpo apresenta uma grande variação de título e avidéz pelo antígeno. Outra hipótese é de que Brm estaria associada com a proteína p300 e não com pRb, pois este anticorpo (C36) parece ser capaz de reconhecer também a proteína p300. Esta questão, também deve ser investigada, pois p300 é uma proteína intimamente ligada à regulação do ciclo celular (Eckner et al, 1994). Possui alta homologia com CBP (CREB binding protein) (Chrivia et al, 1993; Eckener et al, 1993 e Arany et al, 1994), estando ambas presentes em complexos intracelulares com TBP ("TATA binding protein") (Abraham et al, 1992 e Dallas et al, 1997), co-fatores para p53 (Avantiaggiatti et al, 1997) e, principalmente para o nosso modelo de estudo, com receptores de hormônios nucleares (Chakravarti et al, 1996 e Hanstein et al, 1996). Também possuem atividade intrínseca de histona acetiltransferase (HAT), sugerindo uma regulação da transcrição através de mudanças conformacionais da cromatina, sendo capazes de interagir com o complexo SWI/SNF (Dallas et al, 1998).

Análise detalhada das bandas que co-imunoprecipitam com BRG/Brm é muito importante, como discutido acima, uma vez que diferenças de componentes destas bandas entre as linhagens ST1 e P7 poderiam auxiliar no entendimento das diferenças observadas na resposta ao tratamento com Hy

destas duas linhagens. Recentemente foram descritas duas diferentes linhagens de tumores humanos, osteosarcoma e de mama, que respondem diferentemente ao tratamento, respectivamente responsiva e resistente, com um antagonista de hormônios glicocorticóides (RU486). A análise dos componentes dos complexos SWI/SNF, mostrou que havia diferenças nestes, entre as diferentes linhagens (Nie et al, 2000).

5.3. Estudo da expressão das proteínas rBrm e rBRG1 em células ST1 e P7.

Através de ensaios de Western blot, foi observado que a proteína rBrm das células P7, apresenta um comportamento anormal, pois esta célula apresenta uma alta concentração desta proteína. Muchardt *et al* (1996) mostraram que Brm, após fosforilação, é degradada nas células em divisão mitótica, sendo novamente sintetizada quando as células entram em G1, além de sofrer um acúmulo em G0. Deste modo células em estado proliferativo, como P7 (tratadas ou não com Hy, em 5% SFB) e ST1 (sem tratamento com Hy, em 5% de SFB) (Mercado, 1997), não devem apresentar um acúmulo desta proteína. Em células ST1 a proteína Brm está sendo acumulada no núcleo após o tratamento com Hy, o qual provoca uma entrada em G0 destas células (Mercado, 1997).

Vários estudos têm mostrado que BRG1 e Brm podem exercer papéis comuns e distintos dentro de uma célula. Ambas são capazes de interagir com receptores nucleares de hormônios (Muchardt & Yaniv, 1993; Chiba *et al*, 1994; Ychinose *et al*, 1997 e Östlund *et al*, 1997) e interagir com pRb (Dunaief *et al*, 1994; Singh *et al*, 1995; Strober *et al*, 1996 e Trouche *et al*, 1997). As duas fazem parte do complexo SWI/SNF, que é importante para transcrição gênica, porém a presença de uma destas proteínas exclui a presença da outra neste complexo, o que leva a crer que estes dois tipos de complexos devem exercer funções diferentes dentro de uma mesma célula (Aalfs *et al*, 2001 e Reisman *et al*, 2002). Alguns trabalhos mostram uma regulação da expressão de genes específicos por BRG1 (Murphy *et al*, 1999 e Barker *et al*, 2001). A presença de BRG1 tanto em células proliferantes como quiescentes e o

acúmulo de Brm só em células que começam a diminuir a proliferação ou estão quiescentes (Muchardt *et al*, 1996 e Muchardt *et al*, 1998), leva à considerações de que, dependendo do estado proliferativo celular, poderia haver uma troca, parcial, de BRG1 para Brm no complexo multiprotéico. Este complexo poderia se ligar a diferentes sítios no DNA, levando a uma expressão de genes importantes para a manutenção de células em quiescência ou manutenção de estágios de diferenciação terminal da célula. Células embrionárias de camundongos *brm* $-/-$, apresentam problemas com o controle do “checkpoint” em G1 e aumento da apoptose, apesar de serem viáveis, possuindo um aumento da concentração da proteína BRG1, o que parece compensar a falta de Brm nestes animais (Reyes *et al*, 1998). Embriões de camundongo *BRG1* $-/-$ não são viáveis, indicando que esta proteína está muito ligada ao desenvolvimento celular. A presença de uma proteína Brm defeituosa em células P7 poderia explicar a diferença entre as células ST1 e P7, quando tratadas com Hy.

Foram feitos ensaios de Northern blot para estudar o efeito do tratamento de células ST1 e P7 com hidrocortisona, sobre os níveis de transcritos do gene *rbrm*, analisando-se o aumento da proteína rBrm nestas duas células estaria relacionado a um aumento nos níveis deste transcrito. Como os genes estudados estão envolvidos na regulação do controle do ciclo celular (Dunaief *et al*, 1994; Trouche *et al*, 1997; Shanahan *et al*, 1999 e La Serna *et al*, 2001), é esperado que seus transcritos sejam pouco abundantes, o que gera a necessidade da utilização de uma amostra enriquecida com RNAm, portanto, esta tem sido a metodologia utilizada em vários trabalhos que estudam a transcrição destes genes (Tamkun *et al*, 1992; Khavary *et al*, 1993, Randazzo *et al*, 1994; Chiba *et al*, 1994; Wang *et al*, 1996a e 1998). Como a sonda utilizada correspondia ao cDNA humano e as células que foram sondadas são murinas, optamos pela utilização do cDNA completo de *aSNF2/brm* como sonda, para garantir maior probabilidade da sonda de cDNA humano conter regiões homólogas aos transcritos das células de rato.

O tratamento com Hy, em células ST1 parece induzir um aumento nos níveis dos transcritos de *rbrm*, o que é correlacionado ao aumento da proteína

encontrado nos ensaios de Western blot. Em células P7, os níveis de transcritos de *brm* estão constantemente baixos, sem qualquer correlação com a alta concentração da proteína, indicando que o acúmulo da proteína Brm pode estar sendo relacionado a uma não degradação da mesma, já que a principal forma de regulação da proteína Brm parece ser sua degradação cíclica, dependente do ciclo celular (revisado em Muchardt & Yaniv, 1999 e 2001).

Deste modo, postulamos que esta proteína poderia ter alguma mutação, que aumentaria sua estabilidade, e ao mesmo tempo, poderia interferir em sua função. Este fenômeno também poderia ser explicado pela perda de função, de alguma outra proteína, que poderia estar regulando a degradação de Brm. A instabilidade mitótica de Brm não é ainda clara, devendo haver participação de complexos de ubiquitinação e proteases (Biggs *et al*, 2001).

Embora já tenha sido descrita uma mutação na proteína Brm, que confere maior estabilidade, na região conhecida como bromodomínio (figura 42) (Muchardt & Yaniv, 1993), esta região não parece ter relação com a atividade transcricional da mesma. Várias outras mutações, que impedem o bom funcionamento de Brm, já foram descritas. Um mutante da região de "ATP binding domain" elimina a atividade transcricional de Brm em ensaios de gene reporter, utilizando o promotor de GR (Muchardt & Yaniv, 1993 e Bourachot *et al*, 1999). Bourachot *et al* (1999) também mostraram que a mutação de uma região C-terminal, rica em resíduos de arginina e lisina (a região KR) (figura 42) interfere em sua capacidade de reverter parcialmente o fenótipo, de células transformadas por *ras*. Esta região é, também, requerida para ativação de GR em ensaios de transfecção transitória. Como pode ser observado na figura 42, KR está muito próximo ao bromodomínio, portanto, é possível a ocorrência de uma mutação que atrapalharia a codificação destas duas regiões da proteína. Isto poderia gerar uma proteína mais estável e sem atividade de co-ativação de GR, o que explicaria o comportamento da proteína Brm presente em células P7. Desta forma, decidimos sequenciar o cDNA do gene correspondente a *rbrm* tanto da linhagem P7 como da ST1.

Bourachot *et al*, 1999

Figura 43. Importância da região C-terminal da proteína Brm para reversão fenotípica de células transformadas por *ras* ativado. A: 1: proteína selvagem; 2: proteína sem a região KR (região rica em arginina e lisina, importante para ação transcricional de Brm); e 3: sem a região do bromodominio (importante para instabilidade da proteína). B: Expressão das proteínas Brm mutadas e selvagem; C: Ensaio de formação de colônias em agar semi-sólido, de células transformadas por *ras* ativado e transfectadas com as diferentes construções de Brm. E7, região de ligação à proteína pRb.

5.4. Seqüenciamento do cDNA correspondente ao gene *rbrm* de células ST1 e P7.

Como não existe a seqüência completa, em banco de dados públicos, do cDNA de *rbrm*, passamos a seqüenciar não somente o cDNA das células P7 e ST1 como também de células REF (células normais de rato). Foram desenhados 3 pares de iniciadores, baseados em seqüências parciais do cDNA de *rbrm*, disponíveis em banco de dados públicos. A estratégia utilizada visava amplificar 3 fragmentos (de aproximadamente 1,5 kpb), os quais corresponderiam a maior parte da região codificadora do cDNA. Estes fragmentos possuem extremidades que se sobrepõem, o que facilitaria a montagem da seqüência completa, posteriormente.

Obtivemos sucesso na amplificação de dois, dos três, fragmentos do cDNA de *rbrm* de células P7 e ST1. A região correspondente aos nucleotídeos 1,5 a 3,0 kpb, não foi amplificada com sucesso. Isto provavelmente se deu devido à alta porcentagem de GC desta região, que pode dificultar a sua amplificação, por não ser desnaturada adequadamente e por formar forte estrutura secundária. Além disso, o desenho dos iniciadores pode estar sub-ótimo ou, ainda, a transcrição reversa pode não estar sendo eficiente nesta região do transcrito. Novos ensaios para amplificação deste fragmento estão sendo realizados, na tentativa de otimizar a amplificação desta região.

A subclonagem dos fragmentos, correspondentes as regiões de 3,0 a 4,5 kpb e de 4,0 a 5,5 kpb, teve pouca eficiência. Apenas um dos fragmentos amplificados de células ST1 (correspondente a 3,0 a 4,5 kpb), foi subclonado com sucesso no vetor pUC18 com sucesso. Os clones obtidos foram seqüenciados, e suas seqüências foram comparadas entre si, para montagem de uma seqüência consenso, de aproximadamente 400 pb. Esta seqüência consenso foi comparada a seqüência humana existente, em banco de dados públicos. Nesta região as seqüências de rato e humano apresentam-se muito conservadas, com uma alta homologia entre si. Devido a somente uma pequena região ter sido seqüenciada não foi possível determinar se o cDNA correspondente ao gene *rbrm*, apresenta mutações.

5.5. Análise dos clones P7 que superexpressam as proteínas hBrm e hBRG1 ou ambas.

Como discutido anteriormente, a proteína Brm de células P7 apresenta um comportamento anormal, sendo que esta linhagem é resistente ao tratamento com Hy. Esta proteína, em células ST1, é induzida pelo tratamento com Hy, e dados da literatura mostram o importante papel desta na ativação de GR. Para avaliar se a resistência da linhagem P7 ao tratamento com Hy, seria devido à proteína Brm desta célula não ser ativa, foram feitos ensaios de superexpressão estável desta proteína em células P7. Esta proteína, como discutido anteriormente, tem um papel fundamental no complexo multiprotéico SWI/SNF, podendo ser substituída por sua homóloga BRG1. Vários estudos têm discutido os diferentes papéis exercidos por complexos formados por BRG1 ou Brm (revisado em Murchardt & Yaniv, 1999 e 2001), mostrando que em alguns casos a presença de uma ou outra, no complexo, gera diferentes fenótipos. Células embrionárias de camundongos *brm* ^{-/-}, apresentam alta expressão de BRG1 (Reyes *et al*, 1998), levando a crer que esta proteína poderia estar substituindo Brm. Porém, estas células apresentam problemas no “checkpoint” de G1, o que indicaria a necessidade de complexos SWI/SNF contendo Brm, para o funcionamento normal celular (revisado em Muchardt & Yaniv, 2001). Além disso, como em células P7 a proteína Brm é encontrada em excesso, ela poderia estar competindo com a proteína BRG1 nos complexos SWI/SNF, o que poderia gerar um desbalanço na composição dos mesmos e consequentemente em suas funções. Richomond & Peterson (1996) estudaram 12 mutações de SWI2, em leveduras, que afetavam sua atividade, mas não a montagem do complexo. Deste modo, foram feitos, também, ensaios de superexpressão da proteína hBRG1 em células P7, a fim de tentar avaliar se isto causaria o mesmo fenótipo, que a superexpressão de hBrm.

A superexpressão da proteína hBrm leva à uma reversão fenotípica das células P7 (resistentes ao tratamento com Hy), gerando clones mais achatados, com crescimento diminuído e com baixa capacidade de formar colônias grandes em substrato sólido e semi-sólido. Provavelmente a proteína Brm das células P7 apresenta-se não ativa, portanto, uma reversão do fenótipo

transformado destas células, após sua re-introdução, corrobora esta hipótese. Linhagens celulares que não possuem Brm e BRG1 são resistentes à parada de crescimento induzida por Rb, sendo que esta resistência pode ser suprimida pela re-introdução de *brm* e *BRG1* (Strobeck *et al*, 2000). Células transformadas pelo oncogene *ras* não expressam a proteína Brm, sendo o fenótipo transformado parcialmente revertido pela superexpressão de Brm nestas células (Muchardt *et al*, 1998). A principal característica analisada nesta reversão é a inabilidade das células de crescerem em substrato semi-sólido de agarose, porém a proteína Brm mutada no domínio KR, não é capaz de reverter este fenótipo (figura 42C; Bourachot *et al*, 1999), esta mutação também gera inabilidade de co-ativação de transcrição via GR. Um dos clones que superexpressam hBrm (p74F), apresenta uma resposta ao tratamento com Hy, com diminuição de sua taxa de crescimento, densidade de saturação e formação de colônia em substrato sólido e semi-sólido de agarose. Este clone apresenta uma taxa de crescimento maior, quando comparado aos outros clones que superexpressam a proteína hBrm, parecida a dos clones controle. É possível que a expressão de hBrm neste clone seja mais baixa que nos outros, portanto a proteína hBrm exógena não estaria causando uma reversão fenotípica total, esta seria alcançada após o tratamento com Hy. Transfecção transitória de Brm em células de carcinoma cervical humano, induz promotores de resposta a GR (Wallberg *et al*, 2000).

A superexpressão da proteína hBRG1 leva à uma mudança fenotípica, com achatamento celular, porém menos intensa do que aquela observada para os clones que superexpressam hBrm, e diminuição na taxa de crescimento e formação de colônias em substrato sólido e semi-sólido. Nenhum dos clones que superexpressam BRG1, apresentou resposta ao tratamento com Hy. Mesmo aqueles clones que superexpressam BRG1 e apresentam uma taxa de crescimento maior, não respondem ao tratamento com Hy, como observado no clone P74F. Este resultado corrobora com a hipótese de mutação, da proteína rBrm de células P7, pois, apesar de BRG1 poder substituir Brm no complexo (Reyes *et al*, 1998) tal complexo não parece ser capaz de regular a resposta ao tratamento com Hy, em células P7.

Muchardt & Yaniv (1999) mostram que a re-introdução de hBrm em células transformadas com oncogenes com MT, ras, raf, pode reverter parcialmente o fenótipo, porém a superexpressão de BRG1 nas mesmas células não é capaz de reverter este fenômeno, indicando que o complexo contendo Brm, neste caso, deve estar mais associado ao controle da proliferação do que o complexo contendo BRG1. O complexo SWI/SNF está relacionado tanto a proliferação como a diferenciação celular, dependendo do modelo e contexto celular (Vignali et al, 2000 e de La Serna et al, 2001). Células que não possuem Brm ou BRG1 têm problemas em responder a parada de crescimento via pRB. Linhagens celulares com defeitos em BRG1 são sensíveis à parada de crescimento induzida por RB, se Brm não esta presente. Ambas proteínas são capazes de inibir expressão de ciclina A, porém somente Brm parece ser capaz de induzir a expressão de CD44, uma glicoproteína transmembranar (Reisma et al, 2002 e Strobeck et al, 2002).

A superexpressão de ambas (hBrm e hBRG1) leva a uma completa reversão fenotípica da linhagem P7. Linhagens celulares sem Brm e BRG1 são resistentes à parada de crescimento induzida por Rb, sendo que, esta resistência pode ser suprimida pela re-introdução destas proteínas (Strobeck et al, 2000), o que leva a um achatamento celular (Dunaief et al, 1994 e Singh et al, 1995). O complexo SWI/SNF é necessário para expressão ordenada de Ciclina E e Ciclina A durante a fase tardia de G1 e S (Zhang et al, 2000). Estes dados, entre outros, mostram uma importante atuação destas proteínas no controle do ciclo celular, portanto é esperado que uma superexpressão de ambas leve a parada e/ou diminuição do crescimento, assim como menor eficiência na formação de colônias, tanto em substrato semi-sólido como em sólido. Entre os clones transfectantes duplos, um deles (P76E) apresenta uma resposta ao tratamento com Hy, com mudança fenotípica (achatamento celular) (figura 38) e diminuição na taxa de crescimento. Como observado para o clones P74F, o clone P76E apresenta um crescimento acima da média encontrada para os outros clones P76. Outros clones apresentam diminuição da formação de colônia em substrato semi-sólido (P76F) ou substrato sólido (P76A), quando tratado com Hy.

É importante notar que os controles utilizados, clones transfectados com vetor vazio (P73), em muitos casos apresentaram diminuição da taxa de crescimento e formação de colônias, quando comparados aos controles transfectados apenas com vetor que confere resistência a higromicina (P72). Este não é um fato isolado na literatura, e mesmo em experimentos do nosso laboratório. Existe a possibilidade de que uma inserção preferencial destes vetores, em regiões específicas do DNA, causaria mudanças estruturais ou alterações transcricionais de genes endógenos. Outros aspectos que poderiam alterar o fenótipo celular, independente da expressão de um gene exógeno, poderiam estar relacionados a modificações inespecíficas, em resposta às diferentes etapas do protocolo de transfecção estável, como inserção de DNA exógeno, interação dos lipossomos com a membrana celular, seleção com antibióticos ou seleção clonal. Devido a estes fatores, foram utilizados os dois tipos de controles, clones P72 e P73, para que fossem avaliadas mudanças de fenótipo devido a superexpressão de Brm e BRG1 e não somente devido a interferências de promotores dos vetores utilizados.

Para uma melhor avaliação da importância de Brm na reversão fenotípica, causada pelo tratamento com Hy, em células ST1, ensaios de supressão de RNA serão feitos. Desta forma poderemos avaliar se a ausência da proteína Brm na linhagem ST1 a tornará insensível ao tratamento com Hy. A análise da expressão das Ciclinas A e E nos clones tranfectantes de hbrm e hBRG1, frente a expressão encontrada nos clones controles também deverá ser avaliada, sabendo-se que, tanto Brm como BRG1 são importantes para expressão normal destas ciclinas, ao longo do ciclo celular.

Produção de um anti-soro capaz de reconhecer BRG1 e Brm em ensaios de Western blot e imunoprecipitação, em células humanas, de rato e camundongo. O que possibilitou o estudo destas proteínas, assim como dos componentes do complexo da qual fazem parte.

A proteína Brm é acumulada no núcleo das células ST1, após tratamento com Hy. Este acúmulo é acompanhado de um aumento nos níveis do transcrito de *brm* nestas células.

Em células P7, a proteína Brm possui um comportamento não esperado, sendo acumulada em seu núcleo, mesmo em células em estado proliferativo constante. Como os níveis deste transcrito, nesta linhagem, apresentam-se baixos, é possível que a alta concentração da proteína Brm, seja devido a uma mutação que afetaria a estabilidade e atividade da mesma.

A superexpressão de *hbrm* e *hBRG1*, nas células P7, leva a um achatamento celular, diminuição na taxa de crescimento e na habilidade de formação de colônia em substrato sólido e semi-sólido.

Alguns clones de células P7, insensíveis ao tratamento com Hy, que superexpressavam a proteína hBrm, passaram a responder ao tratamento com Hy. O clone P74F (*hbrm*) responde ao tratamento com Hy, com diminuição na taxa de crescimento e formação de colônias em substrato sólido e semi-sólido. O clone P76A (*brm/brg*) apresenta uma resposta ao tratamento com Hy, diminuindo o número de colônias formadas em substrato sólido. Os clones P76F e P76E (*brm/brg*) apresentam, respectivamente, diminuição na formação de colônias em substrato semi-sólido e diminuição na taxa de crescimento, assim como achatamento celular, após o tratamento com Hy.

- AALFS, J. D.; NARLIKAR, G. & KIGSTON, R.E. (2001) Functional Differences between the Human ATP-dependent Nucleosome Remodeling Proteins BRG1 and SNF2H. *J. Biol. Chem.*, 276: 34270-78.
- AARONSON, S.A. Growth factors and cancer. *Science*, 1991, 254: 1146-52.
- AARONSON, S.A. & TODARO, G. (1968) Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science*, 162:1024-1026.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. (1994). *Cellular and molecular immunology*. 2 ed., W.B. Saunders, Philadelphia, 457p.
- AGALIOTI, T.; LOMVARDAS, S.; PAREKN, B.; YIE, J.; MANIATIS, T. & THANOS, D. (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, 103: 667-78.
- AKBASAK, A. & SUNAR-AKBASAK, B. (1992) Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. *J. Neurol. Sci.*, 111: 119-33.
- AKERBLOM, I.E.; SLATER, E.P.; BEATO, M.; BAXTER, J.D. & MELLON, P.L. (1988) Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science*, 241: 350-53.
- ARANY, Z., SELLERS, W.R., LIVINGSTON, D.M. & ECKNER, R. (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of co-activators. *Cell*, 77: 799-800.
- ARANY, Z., SELLERS, W.R., LIVINGSTON, D.M. & ECKNER, R. (1994) E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of co-activators. *Cell*, 77: 799-800.
- ARCHER, T.K., CORDINGLEY, M.G., WOLFORD, R.G. & HANGER, G.L. (1991) Transcriptional factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol Cell Biol.*, 11:688-98.
- ARMELIN, H.A. & ARMELIN, M.C.S. (1987) The interactions of peptide growth factors and oncogenes. In: *Guroff, G. ed., Oncogenes, genes and growth factors*. p. 331-373, New York, Wiley and Sons.
- ARMELIN, H.A. (1999) Peptide growth factors and cell cycle control. *Biomed. & Pharmacother*, 44: 103-08.
- ARMELIN, H.A., GAMBARINI, A.G. & ARMELIN, M.C.S. (1982) Pituitary fobroblast growth factors and the growth of rat C6 glial cell variants. *Cold Spring Harbor conferences on Cell Proliferation*, 9: 987-96.
- ARMELIN, M.C.S. & ARMELIN, H.A. (1983) Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *Journal of Cell Biology*, 97: 459-65.
- ARMELIN, M.C.S., STOCCO, R.C. & ARMELIN, H.A. (1983) Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. *Journal of Cell Biology*, 97: 455-58.
- ARMELIN, M.C.S., OLIVEIRA, M.L.S., MERCADO, J.M., SASAHARA, R.M., VALENTINI, S.R. & CARVALHO, L.H. (1996) Molecular genetic approach to cell proliferation control and neoplasia. *Braz J. Med Biol. Res.*, 29: 911-19.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. (2002) *Current protocols in molecular biology*. Boston, Greene Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., (revisado).
- AVANTAGIATTI, M., OGRYZKO, L.V., GARDNER, K., GIORDANO, A., LEVINE A.S. & KELLY, K. (1997) Recruitment of p300/CBP in p53 dependent pathways. *Cell*, 89: 1175-84.
- BARKER, N.; HURLSTONE, A.; MUSISI, H.; MILES, A.; BIENZ, M. & CLEVERS, H. (2001). The chormatin remodelling factor Brg-1 interacts with β -catenin to promote target gene activation. *EMBO*, 17: 4935-43.
- BARTEK J.; BARTKOVA J.; LUKAS J. (1997) The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res.*, 237:1-6.
- BEATO, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56: 335-44.
- BEATO, M.; ARNEMANN, J.; CHALEPAKIS, G.; SLATER, E. & WILLMANN, T. (1987) Gene regulation by steroid hormones. *J. Steroid Biochem.*, 27: 9-14.

- BEATO, M.; HERRLICH, P. & SCHÜTZ, G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, **83**: 851-57.
- BENDA, P. LINGHTBODY, J. SATO, G. LEVINE, L. & SWEET, W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161**: 370-71.
- BEUKEN, E.; VINK, C. & BRUGGEMAN, C.A. (1998) One-Step Procedure for Screening Recombinant Plasmids by Size. *BioTechniques*, **24**: 748-50.
- BIEGEL, J.A.; ZHOU, J.; RORKE, L.B., STENSTROM, C.; WAINWRIGHT, L.M. & FOGELGREN, B. (1999) Germ-line and acquired mutation of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res*, **59**: 74-9.
- BIGGS, J.R., YANG, J., GULLBERG, U., MUCHARDT, C., YANIV, M. and KRAFT, A. S. (2001) The human brm protein is cleaved during apoptosis: The role of cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **98**: 3814-19.
- BISHOP, J.M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**: 235-48.
- BONIFACINO, J.S.; DASSO, M.; HARFORD, J.B.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. and YAMADA, K.M. (2000) *Current protocols in cell biology*. Boston, Greene Publishing Associates, Inc. John Wiley & Sons, Inc., (revisado).
- BOCHAR, D.A.; WANG, L.; BENIYA, H.; KINEV, A.; XUE, Y.; LANE, W.S.; WANG, W.; KASHANCHI, F. & SHIEKHATTAR, R. (2000) BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*, **102**: 257-65.
- BOURACHOT, B., YANIV, M. & MUCHARDT, C. (1999) The Activity of Mammalian brm/SNF2 α is dependent on a High-Mobility-Group Protein I/Y-like DNA binding domain. *Mol Cell Biol*, **19**: 3931-39.
- BRADFORD, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248054.
- BREHM A.; MISKA E.A.; MCCANCE D.J.; REID J.L.; BANNISTER A.J. & KOUZARIDES T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, **391**:597-601
- BRESNICK, E.H., RORIES, C. & HAGER, G.L. (1992) Evidence that nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter adopt specific translational positions. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 865-70.
- BRUMMELKAMP, T.R.; BERNARDS, R. & AGAMI, R. (2002) A Sustem for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science*, **296**: 250-3.
- BULLOCK, W.O.; FERNANDEZ, J.M. & SHORT, J.M. (1987) A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**: 376.
- BURNS, K.; DUGGAN, B.; ATKINSON, E.A.; FAMULSKI, K.S.; NEMER, M.; NLEACKLEY, R.C. & MICHALAK, M. (1994) Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, **367**: 476-80.
- CAIRNS, B.R.; HENRY, N.L. & KORBERG, R.D. (1996) TFG/TAF30/ANC1, a component of yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins RNL and AF-9. *Mol Cell Biol.*, **16**: 3308-16.
- CAIRNS, B.R.; KIM, Y.J.; SAYRE, M.H.; LAURENT, B.C. & KORNBERG, R.D. (1994) A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5 and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 1950-54.
- CHAKRAVARTI, D., La MORTE, V., NELSON, M., NAKAUMA, T., SCHULMAN, I.G., JUGUILON, H., MONTMINY, M. & EVANS, R. (1996) Role of CBP/p300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, **383**: 99-103.
- CHENG, S.W., DAVIES, K.P., YUNG, E., BELTRAN, R.J., YU, J. & KALPANA, G.V. (1999) c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Gent*, **1**: 102-5.
- CHIBA, H.; MARAMATSU, M.; NOMOTO, A. and KATO, H. (1994) Two human homolgues of *Saccharomyces cerevisiae* SEI2/SNF2 and *Drosophila brahma* are transcriptional activators cooperating with the estrogen receptor and teh retinoic acid recptor. *Nucl. Acids Res.*, **22**: 1815-20.

- CHO, H.; ORPHANIDES, G.; SUN, X.; YANG, X.J.; OGRYZKO, V.; LEES, E.; NAKATANI, Y. & REINBERG, D. (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol*, **18**: 5355-63.
- CHIRGWIN, J.M.; PRZYBYLA, A.E.; MacDONALD, R.J. & Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.*, **18**: 5294-9.
- CHRIVIA, J.C., KWOK, R.P.S., LAMBR, N., HAGIWARA, M., MONTMINY, M.R. & GOODMAN, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**: 855-59.
- CLAPHAM, D.E. (1995) Calcium Signaling. *Cell*, **80**: 259-68.
- COLEMAN, R.E. (1992) Glucocorticoids in cancer therapy. *Biotherapy*, **4**: 37-44.
- COSTANZI E.; RAMEH L.; JOAZEIRO, C. & ARMELIN, M.C.S. (1990) Generation of cell lines to study the role played by oncogenes and anti-oncogenes in cell proliferation control. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **23**: 795-99.
- CROSS, M. & DEXTER, M. (1991) Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, **64**: 271-80.
- DAHIYA, A., GAVIN, M.R., LUO, R.X. & DEAN, D.C. (2000) Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol*, **18**: 6799-805.
- DALLAS, P.B., CHENEY, I.W., LIAO, D., BOWRIN, V., BYAM, W., PACCHIONE, S., KOBAYASHI, R., YACIUK, P. & MORAN, E. (1998) p300/CREB binding protein-related protein p270 is a component of mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell Biol*, **18**: 3596-3603.
- DALLAS, P.B., YACIUK, P. & MORAN, E. (1997) Characterization of monoclonal antibodies raised against p300: both p300 and CBP are present in intracellular TBP complexes. *J. Virol*, **71**: 1726-31.
- DAVIS, J.L., KUNISAWA, R. & THORNER, J. (1992) A presumptive helicase (MOT1 gene product) affects gene expression and is required for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, **12**: 1879-92.
- DeCRISTOFARO, M.F.; BETZ, B.L.; RORIE, C.J.; REISMAN, D.N.; WANG, W. & WEISSMAN, B.E. (2001) Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J. Cell. Physiology*, **186**: 136-45.
- DeCRISTOFARO, M.F.; BETZ, B.L.; WANG, W. & WEISSMAN, B.E. (1999) Alteration of hSNF5/INI1/BAF47 detected in primary rhabdomyosarcomas and rhabdoid cell lines but not primary Wilms' tumors. *Oncogene*, **18**: 7559-65.
- DeGREGORI J.; LEONE G.; OHTANI K.; MIRON A.; NEVINS J.R. (1995) E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev*, **23**: 2873-87.
- de La SERNA, I.L., CARLSON, K.A., HILL, D.A., GUIDI, C.J., STEPHENSON, R.O., SIF, S., KINGSTON, R.E. & IMBALZANO, A.N. (2000) Mammalian SWI-SNF complexes contribute to activation of the hsp 70 gene. *Mol Cell Biol*, **8**: 2839-51.
- DE LA SERNA I.L.; CARLSON K.A. & IMBALZANO A.N. (2001) Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet Feb*, **27**: 187-90.
- DHALLUIN, C.; CARLSON, J.E.; ZENG, L.; HE, C.; AGGARWAL, A.K. & ZHOU, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**: 491-96.
- DIAMOND, M.I., MINER, J., YOSHINAGA, S.K., YANAMOTO, K.R. (1990) Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science*, **249**: 1266.
- DIRENZO J, SHANG Y, PHELAN M, SIF S, MYERS M, KINGSTON R, BROWN M. (2000) BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 7541-9
- DISTELHORST, C.W. & DUBYAK, G. (1998) Role of calcium in glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes and lymphoma cells: resurrection of old theories by new findings. *Blood*, **91**: 731-34.
- DOWDY, S.F.; HINDS, P.W.; LOUISE, K.; REED, S.I.; ARNOLD, A. & WEINBERG, R.A. (1993). Physical Interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, **73**: 499-511.

- DUNAIEF, J.L.; STROBER, B.E.; GUHA, S.; KHAVARI, P.A.; ALIN, K.; LUBAN, J.; BEGEMANN, M. CRABTREE, G.R. and GOFF, S.P. (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induction cell cycle arrest. *Cell*, **79**: 119-30.
- DYSON, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **15**:2245-62.
- EASTMAN-REKS, S.B. & VEDECKS, W.V. (1996) Glucocorticoid inhibition of *c-myc*, *c-myb* and *c-k-ras* expression in a mouse lymphoma cell line. *Cancer Res.*, **46**: 2457-62.
- ECKNER, R., EWEN, M.E., NEWSOME, D., DeCAPRIO, J.A., LAWRENCE, J.B. and LIVINGSTON, D.M. (1994) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kd protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*, **8**: 869-84.
- ELFRING, L.K.; DANIEL, C.; PAPOULAS, O.; DEURING, R.; SARTE, M.; MOSELEY, S.; BEEK, S.J.; WALDRIP, W.R.; DAUBRESSE, G.; DePACE, A.; KENNISON, J.A. & TAMKUN, J.W. (1998) Genetic analysis of brahma: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics*, **148**: 251-65.
- EPINAT, J.C. & GILMORE, T.D. (1999) Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene*, **18**: 6896-6909.
- FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Bioch.*, **137**:266-7.
- FERREIRA, R.; NAGUIBNEVA, I.; MATHIEU, M.; AIT-SI-ALI, S.; ROBIN, P.; PRITCHARD, L.L. & HAREL-BELLAN, A. (2001) Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO*, **2**: 794-9.
- FLETCHER, T.M. & HANSEN, J.C. (1996) The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **6**: 149-88.
- FRESHNEY, R.I. (1984) Effects of glucocorticoids on glioma cells in culture. *Exp. Cell. Biol.*, **52**: 286-92.
- FRIEND, S.; BERNARDS, R.; ROGELJ, S.; WEINBERG, R.; RAPAPORT, J.; ALBERT, D. & DRYJA, T. (1986) A human DNA fragment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**: 643-46.
- FRYER, C.J. & ARCHER, T.K. (1998) Chromatin remodelling by glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*, **393**:88-91
- FUNG, Y.K.; MURPHREE, A.L.; TÁNG, A.; QIAN, J.; HINRICHS, S.S. & BENEDICTT, W.F. (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, **236**: 1657-61.
- GAYNON, P.S. & LUSTIG, R.H. (1995) The use of glucocorticoids in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Molecular, cellular, and clinical considerations. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **17**: 1-12.
- GELIUS, B.; WADE, P.; WOLFE, A. & WRANG, O. and ÖSTLUND FARRANTS, A.K. (1999) Characterization of a chromatin remodelling activity in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.*, **262**: 426-34.
- GRAÑA, X. & REDDY, P. (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, **11**: 211-19.
- GRAND, F.; KULKARNI, S.; CHASE, A.; GOLDMAN, J.M.; GORDON, M. & CROSS, N.C.P. (1999) Frequent deletion of hSNF5/INI1, a component of the SWI/SNF complex, in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, **59**: 3870-74.
- GRUNSTEIN, M. (1997) Histone acetylation is chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**: 349-52.
- WEINERT, T.A. (1989) Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**: 629-34.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557.
- HANSTEIN, B., ECKNER, R., DiRENZO, J., HALACHMI, S., LIU, H., SEARCY, B., KUOKAWA, R. & BROWN, M. (1996) p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 11540-45.

- HARLOW, E. & LANE, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- HAVAS K, FLAUS A, PHELAN M, KINGSTON R, WADE PA, LILLEY DM, OWEN-HUGHES T. (2000) Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell*, 103: 1133-42.
- HELDIN, C.H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80: 213-223.
- HELIN, K. (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev.*, 8:28-35.
- HELMBERG, A.; AUPHAN, N.; CAELLES, C. & KARIN, M. (1995) Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 14: 452-60.
- HERRLICH, P. & PONTA, H. (1985) Nuclear oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *Trends Genet.*, 5: 112-16.
- HERRLICH, P. (2001) Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene*, 20: 2465-75.
- HERSCHMAN, H.R. (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoter. *Ann. Rev. Biochem.*, 60: 281-319.
- HILL, C.S. & TREISMAN, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80:199-211.
- HIRSCHHORN, J.N.; BROWN, S.A.; CLARK, C.D. & WINSTON, F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.*, 6: 2288-98.
- HOLSTEGE, F.C.; JENNINGS, E.G.; WYRICK, J.J.; LEE, T.I.; HENGARTNER, C.J.; GREEN, M.R.; GOLUB, T.R.; LANDER, E.S. & YOUNG, R.A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, 95: 717-28
- HONG, L.; SCHROTH, G.P.; MATTHEWS, H.R.; YAU, P. & BRADBURY, E.M. (1993) Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.*, 268: 305-14.
- HSIEH Y.J.; KUNDU T.K.; WANG Z.; KOVELMAN R. & ROEDER R.G. (1999) The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, 19: 7697-704.
- HUDSON, B.P.; MARTINEZ-YAMAOUT, M.A.; DYSON, H.J. & WRIGHT, P.E. (2000) Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain. *J. Mol. Biol.*, 304: 355-70.
- ITO, T.; BULGER, M.; PAZIN, E.M.; KOBAYASHI, R. & KADONAGA, J.T. (1997) ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*, 90: 145-55.
- JONES, S.M. & KAZLAUSKAS, A. (2000) Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene*, 19: 5558-67.
- KADAM, S.; McALPINE, G.S.; PHELAN, M.L.; KINGSTON, R.E.; JONES, K.A. & EMERSON, B.M. (2000) Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.*, 14: 2442-51.
- KAELIN WG J.R. (1997) Alterations in G1/S cell-cycle control contributing to carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 833:29-33.
- KASPERS, G.J.; VEERMAN, A.J.; POPP-SNIJDERS, C.; LOMECKY, M.; VAN ZANTWIJK, C.H.; SWINKELS, L.M.; VAN WERING, E.R. & PIETER, R. (1996) Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Pediatr. Oncol.*, 27: 114-21.
- KHAVARI, P. A.; PETERSEN, C. L.; TAMKUM, J.W.; MENDEL, D. B. & CRABTREE, G. R. (1993) Brg1 contains a conserved domain of the Swi2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*, 366: 170-74.

- KING, K.L. & CIDLOWSKI, J.A. (1998) Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Ver. Physiol.*, **60**: 601-17.
- KINGSTON, R.E.; BUNKER, C.A. & IMBALZANO, A.N. (1996) Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes & Dev.*, **10**: 905-20.
- KOVARY, K.; ARMELIN, M.C. & ARMELIN, H.A. (1989) Glucocorticoid dexamethasone reversibly complements EJ-RAS oncogene to transform mouse embryo BALB-3T3. *J. Cell Biochem.*, **41**: 171-7.
- KOVARY, K. & BRAVO, R. (1991) Expression of different Jun and Fos proteins during the G₀ to G₁ transition in mouse fibroblasts: *in vitro* and *in vivo* associations. *Molecular and Cellular Biology*, **11**: 2451-59.
- KOWENZ-LEUTZ & LEUTZ (1999) A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol Cell*, **4**: 735-43.
- KREBS JE, PETERSON C.L. (2000) Understanding "active" chromatin: a historical perspective of chromatin remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, **10**: 1-12.
- KUERBITZ, S.J.; PLUNKETT, B.S.; WALSH, W.W. & KASTAN, M.B. (1992) Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 7491-95.
- KUNDU T.K.; WANG Z.; ROEDER R.G. (1999) Human TFIIC relieves chromatin-mediated repression of RNAPolymerase III transcription and contains an intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol.* **19**: 1605-15.
- KWON, H.; IMBALZANO, A.N.; KHAVARI, P.A.; KINGSTON, R.E. and GREEN, M.R. (1994) Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature.*, **370**: 477-81.
- LABORDA, J. (1991) 36B4 cDNA used as an estradiol- independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acid Research*, **19**: 3998.
- LAURENT, B.C.; YANG, X. & CARLSON, M. (1992) An essential *Saccharomyces cerevisiae* gene homologous to SNF2 encodes a helicase-related protein in a new family. *Mol. Cell Biol.*, **12**: 1893-1902.
- LAURENT, B.C., XANG, X. & CARLSON, M. (1993) The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.*, **7**: 583-91.
- LEE, D.Y.; HAYES, J.J.; PRUSS, D. & WOLFFE, A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, **72**: 73-84.
- LEE, D.; SOHN, H.; KALPANA, G.V. & CHOE, J. (1999) Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature*, **399**: 487-91.
- LeGOUY, E.; THOMPSON, E.M.; MUCHARDT, C. & RENARD, J.P. (1998) Differential preimplantation regulation of two mouse homologues of the yeast SWI2 protein. *Dev. Dynamics*, **212**: 38-48.
- LIU, R.; LIU, H.; CHEN, X.; KIRBY, M.; BROWN, P.O. & ZHAO, K. (2001) Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell*, **10**: 309-18.
- LOWE, S.W.; SCHMITH, S.W.; OSBORNE, B.A. & JACKS, T. (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, **362**: 847-49.
- LUISE, B.F.; XU, W.X.; OTWINOWSKI, Z.; FREEDMAN, L.P.; YAMAMOTO, K.R. & SIGLER, P.B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, **352**: 497-505.
- LUO R.X.; POSTIGO A.A. & DEAN D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, **92**: 463-73.
- MAGNAGHI-JAULIN L.; GROISMAN R.; NAGUIBNEVA I.; ROBIN P.; TROUCHE D. & HAREL-BELLAN A. (1998) Histone deacetylase and retinoblastoma protein. *Bull Cancer*, **85**: 606-7.
- MARIGNANI, P.A.; KANAI, F. & CARPENTER, C.L. (2001) LKB1 associates with Brg1 and is necessary for Brg1-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.*, **276**: 32415-18.
- MARSHALL, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**: 179-85.
- MARX, J. (1994) How cells cycle toward cancer. *Science*, **263**: 319-21.

- MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P. & EVANS, R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**: 835-39.
- McEWAN, I.J.; WRIGHT, A.P. & GUSTAFSSON, J.A. (1997) Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions. *Bioassays*, **19**: 153-60.
- MERCADO, J.M.M. Reversão fenotípica de células ST1 induzida por hormônios glucocorticóides: análise ao nível de ciclo celular e de genes supressores de tumor. [Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 1997].
- MINER, J.N. & YAMAMOTO, K.R. (1991) Regulatory crosstalk at composite response elements. *Trends Biochem. Sci.*, **16**: 423-26.
- MORRIS, E.J. & DYSON, N.J. (2001) Retinoblastoma protein partners. *Adv. Cancer Res.*, **82**: 1-54.
- MUCHARDT, C.; BOURACHOT, B.; REYES, J.C. AND YANIV. (1998) *ras* transformation is associated with decreased expression of the *brm*/*SNF2 α* ATPase from the mammalian SWI-SNF complex. *The EMBO Journal*, **17**: 223-31.
- MUCHARDT, C.; REYES, J.C.; BOURACHOT, B.; LEGOUY, E. and YANIV, M. (1996) The *hbrm* and *BRG-1* proteins, components of the human *SNF*/*SWI* complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *The EMBO Journal*, **15**: 3394-02.
- MUCHARDT, C.; SARDET, C.; BOURACHOT, B.; ONUFRYK, C. and YANIV, M. (1995) A human protein with homology to *Saccharomyces cerevisiae* *SNF5* interacts with the potential helicase *hbrm*. *Nucleic Acids Res.*, **23**:1127-32.
- MUCHARDT, C. & YANIV, M. (1993) A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* *SNF2*/*SWI2* and *Drosophila* *brm* genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *The EMBO Journal*, **12**: 4279-90.
- MUCHARDT, C. & YANIV, M. (1999) The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Cell & Dev Biol*, **10**: 189-95.
- MUCHARDT, C. & YANIV, M. (2001) When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle. *Oncogene*, **20**: 3067-75.
- MURRAY, A.W. & HUNT, R.T. (1993) The Cell Cycle. W.H. Freeman, New York.
- MURPHY, D.; HARDY, S. & ENGEL, D.A. (1999) Human SWI/SNF Component BRG1 Represses Transcription of the *c-fos* Gene. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 2724-33.
- NAGAI, M.; TANAKA, S.; TSUDA, M.; ENDO, S.; KATO, H.; SONOBE, H.; MINAMI, A.; HIRAGA, H.; NISHIHARA, H.; SAWA, H. & NAGASHIMA, K. (2001) Analysis of transformation activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT_SX1 bound to chromatin remodeling factor *hBRM*/*hSNF2 α* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 3843-48.
- NARLIKAR G.J.; FAN H.Y. & KINGSTON R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**: 475-87.
- NASMYTH, K. (1996) Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, **274**:1643-5.
- NEISH, A.S.; ANDERSON, S.F.; SCHLEGEL, B.P.; WEI, W. & PARVIN, J.D.. (1997) Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Research*, **25**:847-53.
- NIE, Z.; XUE, Y.; YANG, D.; ZHOU, S.; DEROO, B.J.; ARCHER, T.K. & WANG, W. (2000) A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 8879-88.
- NIGHTINGALE K.P.; WELLINGER R.E.; SOGO J.M. & BECKER P.B. (1998) Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila* *hsp26* gene in chromatin. *EMBO J.*, **10**: 2865-76.
- NIWA, H.; YAMAMURA, K. & MIYAZAKI, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, **108**: 193-09.
- NODA, M. (1993) Mechanisms of reversion. *The FASEB Journal*, **7**: 834-40.
- NORTON, V.G.; IMAI, B.S.; YAU, P. & BRADBURY, E.M.. (1989). Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*, **57**: 449-57.

- OGRYZKO, V.V. (2001) Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**: 683-92.
- OKABE I.; BAILEY L.C.; ATTREE O.; SRINIVASAN S.; PERKEL J.M.; LAURENT B.C.; CARLSON M.; NELSON D.L. & NUSSBAUM R.L. (1992) Cloning of human and bovine homologs of SNF2/SWI2: a global activator of transcription in yeast *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **20**: 4649-55.
- ORLANDO V. & PARO R. (1995) Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Opin Genet Dev*, **5**: 174-9.
- ÖSTLUND FARRANTS, A.K.; BLOMQUIST, P.; KWON, H. and WRANGE, Ö. (1997) Glucocorticoid Receptor-Glucocorticoid Response Element Binding Stimulates Nucleosome Disruption by the SWI/SNF Complex. *Molecular and Cellular Biology*, **17**: 895-905.
- O'MALLEY, B. (1990) The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endocrinol.*, **4**: 363-64.
- O'NEILL D, YANG J, ERDJUMENT-BROMAGE H, BORNESCHLEGEL K, TEMPST P, BANK A. (1999) Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 349-54.
- OWEN, D.J.; ORNAGHI, P.; YANG, J.C.; LOWE, N.; EVANS, P.R.; BALLARIO, P.; NEUHAUS, D.; FILETICI, P. & TRAVERS, A.A. (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.*, **19**: 6141-49.
- PAPOULAS, O.; BEEK, S.J.; MOSELEY, S.L.; McCALLUM, C.M.; SARTE, M.; SHEARN, A. & TAMKUN, J.W. (1998) The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development*, **125**: 3955-3966.
- PARANJE, S.M.; KAMAKAKA, R.T. & KADONAGA, J.T. (1994) Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**: 265-97.
- pET SYSTEM MANUAL. By Novagen, Inc., (1995).
- PETERSON, C.L. & HERSKOWITZ, I. (1992) Characterization of the yeast SWI1, SWI2 e SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell*, **68**: 573-83.
- PICARD D.; KUMAR V.; CHAMBON P. & YAMAMOTO K.R. (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul.*, **1**: 291-9.
- PICARD, D. & YAMAMOTO, K.R. (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, **6**: 3333-40.
- POMPÉIA, C. Geração, purificação e caracterização de antisoros contra oncoproteínas das famílias Fos e Jun e citocina JE/MCP-1 produzidas em bactérias. [Tese de Mestrado apresentada no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química - USP, 1996]
- POMPÉIA, C.; ORTIS, F. and ARMELIN, M.C.S. (1997) Use of pEX and pGEX bacterial heterologous protein expression systems for recombinant oncoprotein production and antisera generation. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **25**: 207-15.
- RAMEH, L.F.E. & ARMELIN, M.C.S. (1992) Downregulation of *JE* and *KC* genes by glucocorticoid does not prevent the G0→G1 transition in Balb/3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 4612-21.
- RANDANZZO, F.M.; KHAVARI, P.; CRABTREE, G.; TAMKUN, J. and ROSSANT, J. (1994) *brg 1*: A putative murine homologue of the *Drosophila bahma* gene, a homeotic gene regulator. *Developmental Biology*, **161**: 229-242.
- RAY, A. & PREFONTAINE, K.E. (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-κB and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 752-56.
- REISMAN, D.N.; STROBECK, M.W.; BETZ, B.L.; SCIARIOTTA, J.; FUNKHOUSER, W. Jr.; MURCHARDT, C.; YANIV, M.; SHERMAN, L.S.; KNUDSEN, E.S. & WEISSMAN, B.E. (2002) Concomitant down-regulation of BRM and BRG1 in human tumor cell lines: differential effects on RB-mediated growth arrest vs CD44 expression. *Oncogene*, **21**: 1196-207.

- REYES, J.C.; BARRA, J.; MUCHARDT, C.; CAMUS, A.; BABINET, C. and YANIV, M. (1998) Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian bHLH (SNF2alpha). *The EMBO Journal*, **17**: 6979-91.
- REXIN, M.; BUSCH, W.; SEGNETZ, B. & GEHRING, U. (1992) Structure of the glucocorticoid receptor in intact cells in the absence of hormone. *J. Biol. Chem.*, **267**: 9619-21.
- RICHMOND, E. & PETERSO N, G.L. (1996) Functional analysis of the DNA-stimulated ATPase domain of yeast SWI2/SNF2. *Nucleic Acids Research*, **24**: 3685-92.
- RIVA, M.A.; FUMAGALLI, F. & RACAGNI, G. (1995) Opposite regulation of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor gene expression in rat cortical astrocytes following dexamethasone treatment. *J. Neurochem*, **64**: 2526-33.
- ROSTY, C.; PETER, M.; ZUCMAN, J.; VALIDIRE, P.; DELATTRE, O. & AURIAS, A. (1998) Cytogenetics and molecular analysis of t(1;22)(p36: 11.2) in a rhabdoid tumor with putative homozygous deletion of chromosome 22. *Genes Chromosomes Cancer*, **21**: 82-89.
- SAWA H.; KOUIKE H. & OKANO H. (2000) Components of the SWI/SNF complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Mol. Cell*, **6**: 617-24
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning-a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANCHEZ, E.R. (1990) Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both HSP70 and HSP90. *J. Biol. Chem.*, **265**: 201-23.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **74**: 5463-67.
- SEVENET, N.; LELLOUCH-TUBIANA, A.; SCHOFIELD, D.; HOANG-XUAN, K.; GESSLER, M.; BIRNHAUM, D.; JEANPIERRE, C.; JOUVET, A. & DELATTRE, O. (1999) Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet*, **8**: 2359-68.
- SHANAHAN, F., SEGHEZZI, W., PARRY, D., MAHANY, D. & LEES, E. (1999) Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol*, **19**: 1460-69.
- SHERR, C.J. (1994) G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell*, **79**: 551-5.
- SHERR, R. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**: 1672-7.
- SIF, S.; STUKENBERG, P.T.; KIRSCHNER, M.W. & KINGSTON, R.E. (1998) Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes Dev*, **12**: 2842-51.
- SILVER, P.A. (1991) How proteins enter the nucleus. *Cell*, **64**: 489-97.
- SINGH, P.; COE, J. and HONG, W. (1995) A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Nature*, **374**: 562-5.
- SIR, S.; STUKENBERG, P.T.; KIRSCHNER, M.W. & KINGSTON, R.E. (1998) Mitotic Inactivation of a Human SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex. *Genes & Development*, **18**: 2842-51.
- STAEHLING-HAMPTON, D.; CIAMPA, P.J.; BROOK, A & DYSON, N. (1999). A Genetic Screen for Modifiers of E2F in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **153**: 275-87.
- STERN, M.; JENSEN, R. & HERSKOWITZ, I. (1984) Five SWI genes are required for expression of the HO genes in yeast. *J. Mol. Biol.*, **178**: 853-68.
- STROBECK, M.W.; DeCRISTOFARO, M.F.; BANINE, F.; WISSMAN, B.E.; LARRY, S.S. & KNUDSEN, E.S. (2001) The BRG-1 Subunit of the SWI/SNF Complex Regulates CD44 Expression. *J. Biol Chem.*, **276**: 9276-78.
- STROBECK, M.W., KNUDSEN, K.E., FRIBOURG, A.F., DeCRISTOFARO, M.F., WEISSMAN, B.E., IMBALZANO, A.N. & KNUDSEN, E.S. (2000) BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA*, **14**: 7748-53.
- STROBECK, M.W.; REISMAN, D.N.; GUNAWARDENA, R.W.; BETZ, B.L.; ANGUS, S.P.; KNUDSEN, K.E.; KOWALIK, T.F.; WEISSMAN, B.E. & KUNDSEN, E.S. (2002) Compensation of BRG-1 functions by Brm: insight into the role of the core SWI-SNF subunits in retinoblastoma tumor suppressor signaling. *J. Biol. Chem.*, **277**: 4782-9.

- STROBER, B.E., DUNAIEF, J.L., GUHA, S. & GOFF, S.P. (1996) Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRb family of proteins. *Mol. Cell Biol.*, **16**: 1576-83.
- STUKENBERG, P.T.; LUSTIG, K.D.; McGARRY, T.J.; KING, R.W.; KUANG, J. & KIRSCHNER, M.W. (1997) Systematic identification of mitotic phosphoproteins. *Curr. Biol.*, **7**: 338-48.
- SUDARNASAM, P.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. & WINSTON, F. (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 3364-69.
- SUKHODOLETS M.V. & JIN D.J. (1998) RapA, a novel RNA polymerase-associated protein, is a bacterial homolog of SWI2/SNF2. *J. Biol. Chem.*, **273**: 7018-23.
- TABOR, S. & RICHARDSON, C.C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **84**: 4767-771.
- TANKUN, J.W., DEURING, R., SCOTT, M.P., KINSSINGER, M., PATTATUCCI, A.M., KAUFMAN, T.C. & KENNISON, J.A. (1992) *brhma*: A regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcription activator SNF2/SWI2. *Cell*, **68**: 561-72.
- THOMAS, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 5201-5.
- TREICH, I.; CAIRNS, B.R.; de los SANTOS, T.; BREWSTER, E. & CARLSON, M. (1995) SNF11, a component of the yeast SNF-SWI complex that interact with a conserved region of SNF2. *Mol Cell Biol*, **15**: 4240-48.
- TROUCHE, D., LE CHALONY, C., MUCHARDT, C., YANIV, M. & KOUZARIDES, T. (1997) RB and hbrm cooperate to repress the activation function of E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 11268-73.
- TROUCHE D. & KOUZARIDES T. (1996) E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 1439-42.
- TSE C.; GEORGIEVA EI.; RUIZ-GARCIA AB.; SENDRA R & HANSEN JC. (1998) Gcn5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J Biol Chem*, **273**: 32388-92.
- TSUKIYAMA, T.; DANIEL, C.; TAMKUN, J. & WU, C. (1995) ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140-kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell*, **83**: 1011-1020.
- UNDERHILL, C.; QUTOB, M.S. YEE, S.P. & TORCHIA, J. (2000) A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J. Biol. Chem.*, **275**: 40463-70.
- URA K.; KURUMIZAKA H.; DIMITROV S.; ALMOUZNI G. & WOLFFE A.P. (1997) Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J.*, **16**: 2096-107.
- URNOV, F.D. & WOLFFE, A.P. (2001) Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene*, **20**: 2991-3006.
- VALENTINI, S.R. Bases moleculares da reversão fenotípica induzida por hormônios glicocorticóides nas células C6 de glioma de rato. [Tese de Doutorado apresentada no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 1993].
- VALENTINI, S.R. & ARMELIN, M.C.S. (1996) Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *Journal of Endocrinol.*, **148**: 11-17.
- VARGA-WEISZ, P.D.; BLANK, T.A. & BECKER, P.B. (1995) Energy-dependent chromatin accessibility and nucleosome mobility in a cell-free system. *EMBO J.*, **14**: 2209-16.
- VARGA-WEISZ, P.D.; WILM, M.; BONTE, E.; DUMAS, K.; MANN, M. & BECKER, P.B. (1997) Chromatin-remodeling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase. *Nature*, **388**: 598-602.
- VEDOY, C.G. & SOGAYAR, M.C. (2002) Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids. *Mol. Brain. Res.*, in press.

- VERTEEGE, I.; SEVENET, N.; LANGE, J.; ROUSSEAU-MERCK, M.; AMBROS, P.; HANDGRETINGER, R.; AURIAS, A. & DELATTRE, O. (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*, **394**: 203-6.
- VETTESE-DADEY, M.; GRANT, P.A.; HEBBES, T.R.; CRANE-ROBINSON, C.; ALLIS, C.D. & WORKMAN, J.L. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.*, **15**: 2508-18.
- VIGNALI, M.; HASSAN, A.H.; NEELY, K.E. & WORKMAN, J.L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*, **20**: 1899-10.
- WADE, P.A. & WOLFFE, A.P. (1999) Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Curr. Biol.*, **9**: 221-14.
- WAGNER D. & MEYEROWITZ E.M. (2002) SPLAYED, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in Arabidopsis.. *Curr Biol*, **22**: 85-94.
- WALLBERG, A.E.; NEELY, K.E.; HASSAN, A.H.; GUSTAFSSON, J.A.; WORKMAN, J.L. & WRIGHT, A.P. Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain. (2000). *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 2004-13.
- WANG, W.; CÔTE, J.; XUE, Y.; ZHOU, S.; KHAVARI, P.A.; BIGGAR, R.; MUCHARDT, C.; DALPANA, G.V.; GOFF, S.P.; YANIV, M.; WORKMAN, J.L. and CRABTREE, G.R. (1996a) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *The EMBO Journal*, **15**: 5370-82.
- WANG J.Y.; KNUDSEN E.S.; WELCH P.J. (1994) The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res*, **64**: 25-85.
- WANG, W.; TIANHUI, C.; XUE, Y.; ZHOU, S.; KUO, A. and CRABTREE, G.R. (1998) Architectural DNA binding by high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 492-98.
- WANG, W.; XUE, Y.; ZHOU, S.; KUO, A.; CAIRNS, B.R. and CRABTREE, G.R. (1996b) Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes & Development*, **10**: 2117-30.
- WATERBORG, J.H. (2000) Steady-state levels of histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, **275**: 13007-11.
- WILSON, C.J.; CHAO, D.M.; IMBALZANO, A.N.; SCHNIZLER, G.R.; KINGSTON, R.E. & YOUNG, R.A. (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell*, **84**: 235-44.
- WOLFFE, A.P. (1994) Transcriptional in tune with histones. *Cell*, **77**: 13-16.
- WOLFFE, A.P. (1994) Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 240-44.
- WOLFFE, A.P. (2001) Chromatin remodeling: why it is important in cancer. *Oncogene*, **24**: 2988-90.
- WOLFFE, A.P. & HAYES, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification *Nucleic. Acid. Res.*, **27**: 711-20.
- WONG, A.K.; SHANAHAN, F.; CHEN, Y.; LIAN, K.; GRUPTE, J.; SWEDLUND, B.; TAVTIGIAN, S.V.; TENG, D.H. & LEES, E. (2000) BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**: 6171-77.
- WU, D.Y.; KALPANA, G.V.; GOFF, S.P. & SCHUBACK, W.H. (1996) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA 2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/INI1. *J. Virol*, **70**: 6020-28.
- XUE, Y.; CANMAN, J.C.; LEE, C.S.; NIE, Z.; YANG, D.; MORENO, G.T.; YOUNG, M.K.; SALMON, E.D. & WANG, W. (2000). The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**: 13015-20.
- YAMAMOTO, K.R. (1005) Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.*, **19**: 209-252.
- YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. & MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103-19.

- YASHINAGA, S.K.; PETERSON, C.L.; HERSKOWITZ, I. and YAMAMOTO, K.R. (1992) Role of SWI1, SWI2 and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroids receptors. *Science.*, **258**: 1598-1604.
- YOCHINOSE, H., GARNIER, J.M. CHAMBON, P. & LOSSON, R. (1997) Ligand-dependent interaction between the estrogen receptor and the human homologues of SWI2/SNF2. *Gene.*, **188**: 95-100.
- ZENG L. & ZHOU M.M. (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.*, **513**:124-8.
- ZHANG, H.S., GAVIN, M., DAHIYA, A., POSTIGO, A.A., MA, D., LUO, R.X., HARBOUR, J.W. & DEAN, D.C. (2000) Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*, **101**: 79-89.
- ZHONG, H.; MAY, M.J.; JIMI, E. & GHOSH, S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell.*, **9**: 625-36.
- ZIBERA, C.; GIBELLI, N.; BUTTI, G.; PEDRAZZOLI, P.; CARBONE, M.; MAGRASSI, L. & ROBUSTELLI della CUNA, G. (1992) Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. *Anticancer Res.*, **12**: 1571-74.
- ZOLA, H. (1990) *Laboratory methods in immunology*. CRC, Boca Raton, v.2.

Nome

Fernanda Ortis

Local e data de nascimento

São Paulo, SP, 13 de janeiro de 1973

Educação

- E.E.P.G. Prof. Amadeu Olivério, São Bernardo do Campo, SP, 1980-87
- E.E.S.G. Lauro Gomes de Almeida, S. B. do Campo, SP, 1988-90
- Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo – SP, 1992-1996

Bacharelado em Ciências Biológicas

- Instituto de Química – Universidade de São Paulo – SP, 1997-2002

Ocupação

**Estudante de pós-graduação, nível Doutorado, Instituto de Química –
Universidade de São Paulo, SP**

Bolsista da FAPESP

Publicações

POMPÉIA, C.; ORTIS, F. & ARMELIN, M.C.S. Immunopurification of polyclonal antibodies to recombinant proteins of the same gene family. *Biotechniques*, 1996, 21: 986-90.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., ORTIS, F., SCHUMACHER, R.I. & ARMELIN, M.C.S. Interaction between cationic vesicles and cultures mammalian cells. *Langmuir*, 1997, 13:2215-18.

POMPÉIA, C., ORTIS, F. & ARMELIN, M.C.S. Use of pex and pgex bacterial heterologous protein expression system for recombinant oncoprotein production and antisera generation. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1997, 25: 207-15.