UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS DE DNA (ESTs) DE GENES
REGULADOS POR GLICOCORTICÓIDES NA REVERSÃO
FENOTÍPICA TUMORAL-NORMAL DE CÉLULAS ST1 DE
GLIOMA DE RATO.**

CLEBER GIOVANE VEDDY

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR

SÃO PAULO

Outubro/2000

**“Isolamento, Identificação e Caracterização de Sequências
Expressas de DNA (ESTs) de Genes Regulados por
Glicocorticóides na Reversão Fenotípica Tumoral-Normal
de Células ST1 de Glioma de Rato”.**

CLEBER GIOVANE VEDOY

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

Aprovada por:

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

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

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ - USP

Prof. Dr. ARNALDO ZAHA
UFRGS

Prof. Dr. EMMANUEL DIAS NETO
LUDWIG

SÃO PAULO
17 DE NOVEMBRO DE 2000.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mari Sogayar pela oportunidade de realizar este trabalho.
sua amizade e apoio constante .

A meus pais, por tantos bons exemplos.

Ao Roberto e à Áurea pela amizade, companhia ímpares e pela convivência durante as difícilimas experiências compartilhadas.

A todos os colegas do lab. e técnicos pelo apoio conjunto e pela colaboração diária.

Ao Dr. Claudio Joazeiro pela construção da biblioteca de cDNA no vetor pCM.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

APOIO FINANCEIRO

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.

BIOBRÁS Bioquímica do Brasil S.A.

FBB - Fundação Banco do Brasil.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hormônios glucocorticóides e seu receptor (GR)	1
1.2 Estrutura do receptor de glicocorticóides (GR)	3
1.3 GREs	5
1.4 Regulação gênica pelo receptor de glucocorticóides	6
1.5 Co-ativadores e co-repressores da atividade transcricional de GR	8
1.6 Fosforilação de GR	10
1.7 O efeito anti-tumoral dos glucocorticóides	12
1.8 O sistema celular ST1/P7	13
1.9 Análise da expressão diferencial de genes por subtração de cDNAs	14
1.10 Objetivos do trabalho	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 MATERIAIS	18
2.1.1 Soluções para cultura de bactérias	18
2.1.2 Plasmídeos	18
2.1.3 Oligonucleotídeos	19
2.1.4 Linhagens de células de mamíferos	20
2.1.5 Soluções e meios de cultura	

para células de mamíferos	20
2.1.6 Tampões para eletroforese	21
2.2 MÉTODOS	22
2.2.1 Cultura de células e tratamento com hidrocortisona e/ou cicloheximida.	22
2.2.2 Extração e purificação de RNA total (Chirgwin et al, 1979).	22
2.2.3 Purificação de RNA poliA+.	23
2.2.4 Síntese de cDNAs dupla fita.	23
2.2.5 Eletroforese em geis de agarose e poliacrilamida.	24
2.2.6 Clivagem com enzimas de restrição.	24
2.2.7 Ligação de DNA e transformação de <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF'.	24
2.2.8 Amplificação em cadeia pela polimerase.	25
2.2.9 PCR competitivo.	25
2.2.10 Minipreparações de DNA e sequenciamento de DNA dupla-fita.	
2.2.11. Fracionamento dos produtos subtraídos em gel de poliacrilamida.	26
2.2.10 Preparações de DNA em média escala e deleções unidirecionais com Exo III.	26
2.2.13 Northern blot e marcação de sondas radioativas.	27
2.2.11 Construção e rastreamento de uma biblioteca de cDNA de células ST1 no vetor retroviral pCM.	27
2.2.15 Análise das sequências em bancos de dados.	28

2.2.16	Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose.	28
3	RESULTADOS	29
3.1	Construção da biblioteca ST1HYC5 de cDNAs subtraídos.	29
3.1.1	Geração de amplicons e ligação de adaptadores.	31
3.1.2	Análise da ligação aos adaptadores 1 e 2.	31
3.1.4	Subtração.	33
3.1.5	Análise da eficiência de subtração.	37
3.1.6	Análise do perfil de amplificação das amostras subtraídas em gel de poliacrilamida.	35
3.1.7	Clonagem da amostra subtraída no vetor pBluescript.	39
3.1.8	Confirmação da expressão diferencial dos clones da biblioteca ST1HYC5.	41
3.1.9	Análise do clone ST1HYC5-28	44
3.1.10	Análise do clone ST1HYC5-24	46
3.2	Isolamento e caracterização de um cDNA similar a TN-X em células ST1.	50
3.2.1	Construção do vetor retroviral pCM.	50
3.2.2.	Construção de bibliotecas de cDNA enriquecidas para insertos maiores que 2 kb.	52
3.2.3	Rastreamento da biblioteca ST1-LA utilizando-se o clone ST1HYC5-28.	52
3.2.4	Obtenção e análise da sequência completa de nucleotídeos do cDNA 8B que codifica para TN-X.	53
3.3	Construção da biblioteca ST1HY24.	65
3.3.1	Síntese de cDNAs "driver e tester".	66

3.3.2	Geração de amplicons e ligação de adaptadores.	66
3.3.3	Subtração de sequências positivamente reguladas por Hy em células ST1 tratadas por 24 h.	67
3.3.3.1	Confirmação de clones diferencialmente expressos obtidos a partir da biblioteca ST1HY24.	70
3.3.3.2	Análise da cinética de expressão dos genes correspondentes aos cDNAs subtraídos após tratamento de células ST1 com soro e/ou hidrocortisona.	75
3.3.3.3	Análise da expressão dos genes correspondentes aos cDNAs subtraídos em células ST1, P7 de glioma de rato e U87 de glioblastoma humano.	78
4.	DISCUSSÃO	82
5.	CONCLUSÕES	92
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura de GR e de diferentes GREs promovendo diferentes formas de regulação transcricional a partir das regiões promotoras de genes responsivos a glicocorticóide.	4
Figura 2 -	Análise da eficiência de síntese do cDNA tester (Hy + Chx 5h) para a construção da biblioteca ST1HYC5 por eletroforese em gel de agarose alcalino	30
Quadro 1 -	Esquema das reações de amplificação por PCR a partir das ligações descritas no item 3.1.2.	32
Figura 3 -	Análise da eficiência de ligação dos adaptadores 1 e 2 ao cDNA tester (ST1HYC5).	33
Figura 4 -	Análise do perfil de amplificação das amostras subtraída e não subtraída em gel de poliacrilamida desnaturante.	36
Figura 5 -	Análise da eficiência de subtração nas amostras subtraída e não subtraída	38
Figura 6 -	Análise parcial de alguns clones recombinantes da biblioteca ST1HYC por colônia-PCR.	40
Figura 7 -	Confirmação da expressão diferencial de clones da biblioteca ST1HYC5.	42
Tabela 1 -	Identificação dos clones selecionados da biblioteca ST1HYC5 por sequenciamento de DNA e comparação com bancos de sequências não redundantes pelo programa BLAST.	43
Figura 8 -	Análise do clone ST1HYC5-28.	46
Figura 9 -	Construção de um competidor heterólogo para o proto-oncogene sno.	49
Figura 10 -	Cinética de amplificação de sno em células ST1 tratadas com hidrocortisona.	50

Figura 11 –	Construção do vetor de expressão retroviral pCM	52
Figura 12 –	Sequência nucleotídica e sequência deduzida de aminoácidos do cDNA 8B.	57
Figura 13 –	Alinhamento múltiplo das proteínas TN-X.	60
Tabela 2 –	Motivos de proteínas encontrados na sequência do cDNA 8B pelo programa SMART utilizando o banco pFam.	56
Figura 14 –	Análise da eficiência de ligação dos adaptadores 1 e 2 ao cDNA tester (ST1HY24).	67
Figura 15 –	Análise do perfil de amplificação das amostras subtraída ST1HY24 e não subtraída em gel de poliacrilamida desnaturante	69
Figura 16 –	Análise da eficiência de subtração nas amostras subtraída ST1HY24 e não subtraída	70
Tabela 3 –	Clones selecionados para análise da expressão diferencial na biblioteca ST1HY24	71
Figura 17 –	Confirmação dos clones diferencialmente expressos na biblioteca ST1HY24.	75
Figura 18 –	Análise cinética da expressão dos genes correspondentes aos cDNAs subtraídos após tratamento de células ST1 com soro e/ou hidrocortisona.	78
Figura 19 –	Análise da expressão dos cDNAs subtraídos em células ST1, P7 e U87 na presença e ausência de hidrocortisona (100ng/ml) por Northern blot	81
Tabela 4 –	Lista dos clones cuja expressão é induzida em células ST1 sob tratamento com hidrocortisona presentes nas bibliotecas de cDNAs subtraídos ST1HY24 e ST1HYC-5	82

ABREVIATURAS

AP-1	activator protein 1 (proteína ativadora 1)
Chx	cicloheximida
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CIT	complexo de iniciação transcricional
DBD	DNA binding domain (domínio de ligação a DNA)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxiribonucleotideo trifosfatado
dCTP	desoxicitidina trifosfato
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
EST	Expressed sequence tag (sequência expressa de DNA)
FCS	fetal calf serum (soro fetal bovino)
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC	glicocorticóide
GR	"glucocorticoid receptor" (receptor de glicocorticóide)
GRE	"Glucocorticoid response element" (elemento de resposta a glicocorticóide)
Hy	hidrocortisona
HEPES	ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etano-sulfônico
Kb	kilo pares de bases
LB	"Luria-Bertani medium" (meio LB)
mRNA	RNA mensageiro
MAPK	"Mitogen Activated Protein Kinase" (proteína quinase ativada por mitógeno)
MMTV	"Mouse Mamary Tumor Virus" (Vírus do tumor mamário de camundongo)
MOPS	3-[N-Morpholino] propanosulfonic acid
nGRE	negative GRE (GRE negativo)
NLS	nuclear localization sequence (sequência de localização nuclear)
pb	pares de bases
PKC	protein kinase C
PP2A	proteína fosfatase 2A
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	"sodium dodecyl sulfate" (dodecil sulfato de sódio)
SFB	soro fetal bovino
SSPE	solução salina contendo sódio, fosfato e EDTA, pH7,0
TBE	tampão Tris-Borato-EDTA, pH 8,3
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 7,5

RESUMO

Os hormônios glicocorticóides causam uma completa reversão tanto "in vitro" quanto "in vivo" do fenótipo tumoral para normal, na linhagem celular ST1 de glioma de rato (Armelin & Armelin, 1983) que é um variante da linhagem C6 de glioma de rato.

Neste trabalho, foram construídas bibliotecas normalizadas de cDNAs subtraídos e normalizadas, através da metodologia de PCR supressivo, para identificar genes regulados por glicocorticóides, potencialmente envolvidos na reversão fenotípica de células ST1.

A construção e análise de duas bibliotecas de cDNAs subtraídos, permitiu o isolamento de 7 genes diferencialmente expressos, alguns dos quais são conhecidos efetores do controle da proliferação celular e/ou diferenciação: trombospondina-1, ciclina G, tirosina fosfatase CL100 e NRP/B.

Foi isolado, também, um clone similar a tenascina-X, que apresenta um transcrito de tamanho diferente. O isolamento e caracterização de um cDNA completo correspondente a esse transcrito revelou que é constituído apenas por motivos de fibronectina tipo III e fibrinogênio. A dramática indução deste transcrito por hidrocortisona sugere um papel potencial para esse variante de TN-X no controle da proliferação celular.

A análise da expressão destes genes em células P7, um variante de C6 que não sofre reversão fenotípica mediada com glicocorticóides, e em células U87 de glioblastoma humano, revelou que são expressos em níveis muito baixos ou indetectáveis, nestas células indicando que o produto destes genes pode ter um papel importante na reversão fenotípica tumoral-normal.

A prevalência de transcritos raros e diferencialmente expressos nestas bibliotecas, mostra que são adequadas para o rastreamento, através de métodos automatizados de microarranjos de DNA, para a validação de clones diferencialmente expressos, podendo revelar, rapidamente, um painel de genes candidatos a estarem envolvidos nas respostas anti-proliferativa e anti-tumoral dos glicocorticóides.

ABSTRACT

Treatment of the C6 rat glioma cell variant, ST1 cells, with glucocorticoids, leads to a complete reversion of their transformed phenotype and loss of tumorigenic potential.

In this work, two subtracted and equalized cDNA libraries were constructed, based on suppressive PCR, in order to identify glucocorticoid-regulated genes related to the ST1 phenotypic reversion.

Analysis of both subtracted cDNA libraries revealed 7 differentially expressed genes, some of which are well known negative growth regulators: thrombospondin-1, cyclin G, tyrosine phosphatase CL100 and NRP/B.

In addition, a cDNA clone similar to TN-X, but exhibiting a different transcript size was also isolated. Isolation and characterization of a full-length cDNA corresponding to this transcript, revealed that it is composed of fibronectin type III repeats and one single fibrinogen domain. Glucocorticoid induction of this transcript may suggest a different role of TN-X variants in controlling cell proliferation.

Expression analysis of the C6-derived glucocorticoid-resistant, P7 variant, and of the human glioblastoma U87 cells, revealed very low or undetectable levels of these transcripts, further suggesting that their expression is related to the ST1 cells' phenotypic reversion.

Prevalence of rare and differentially expressed transcripts in these libraries suggests that they are likely to be useful in automated systems (DNA microarrays) to rapidly validate differentially expressed clones and to reveal a panel of candidate genes that mediate the anti-proliferative and anti-tumor effects of glucocorticoids.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hormônios Glicocorticóides e seu receptor (GR)

Glucocorticóides influenciam a vasta maioria de processos fisiológicos, tais como metabolismo intermediário (gliconeogênese), resposta anti-inflamatória, proliferação celular e desenvolvimento. Descobertos nos anos 30, em extratos de glândulas adrenais, os hormônios glucocorticóides (GCs), estavam entre os primeiros hormônios esteróides a serem encontrados. O estudo da ação de GCs forneceu informações importantes sobre os mecanismos utilizados pelos receptores nucleares e outros fatores de transcrição sequência-específicos, para regular transcrição gênica. Durante a década de 70, foi descoberto que GCs exercem seus efeitos através de um receptor específico, GR, uma proteína de ligação a DNA cuja translocação nuclear é induzida após tratamento com o hormônio (Yamamoto, 1985; Beato et al, 1995).

Na ausência do hormônio, GR reside predominantemente no citoplasma das células, onde ele permanece como um grande complexo multiproteico no estado inativado ou não transformado. Este complexo parece consistir do polipeptídeo correspondente ao receptor, duas moléculas da proteína de choque térmico hsp90 e diversas proteínas adicionais. A associação da hsp90 com o receptor parece manter o receptor em um estado de alta afinidade pelo hormônio, sequestrando o receptor no citoplasma por inativação das sequências de localização nuclear (NLS). Uma vez que o hormônio se liga ao receptor, uma mudança conformacional resulta na dissociação da hsp90 e das outras proteínas associadas. Nesta nova conformação (estado ativado ou transformado), GR transloca para o núcleo, onde se liga, como um homodímero, a GREs, que são usualmente encontrados nas regiões promotoras de genes responsivos a GC, bem como a outras proteínas do contexto celular, para controlar a expressão gênica. Desta forma, GR desempenha um papel crucial na determinação da resposta celular a glucocorticóides.

Entretanto, há divergências sobre a distribuição celular e, consequentemente, sobre o mecanismo de translocação nuclear. A literatura indica que GR está presente no citoplasma e no núcleo das células. Há evidências de que ambas formas ativada e não-ativada estão associadas com a membrana plasmática, organelas e núcleo. Evidências morfológicas e bioquímicas mostram que GR é associado com microtúbulos durante diferentes estágios do ciclo celular, sendo co-localizado e co-purificado com tubulina, sugerindo que isto pode ser importante para o mecanismo de ação dos glucocorticóides.

Um grande número de estudos tem mostrado que a concentração de receptores disponíveis é o principal fator limitante na sensibilidade das células a glucocorticóides. Foi demonstrado, por exemplo, que uma linhagem celular sem GR, torna-se insensível a glucocorticóides, como medido pela indução de diversos genes conhecidamente responsivos a glucocorticóides, e que a magnitude das respostas era aproximadamente proporcional ao número de moléculas do receptor (GR) expressas na célula (Vanderbilt et al, 1987). Foi demonstrado também, que a concentração celular de GR parece ser regulada por inúmeros fatores, incluindo glucocorticóides e cAMP. Baseado em ensaios de "binding" ao ligante, foi mostrado que cAMP estimula, enquanto cGMP inibe a ligação dos glucocorticóides em fibroblastos de pele humanos cultivados. Foi determinado que a proporção entre cAMP e cGMP determina a concentração de receptor e, portanto, a atividade do receptor durante a proliferação celular. Usando o mesmo método, foi encontrado que cAMP aumenta o nível de ligação de glucocorticóides em células de linfoma murino. Os efeitos biológicos do cAMP parecem ser mediados pela proteína quinase dependente de cAMP. A ativação desta quinase por cAMP leva à fosforilação de proteínas substrato específicas e, consequentemente, à alteração da atividade ou função destas proteínas (Dong et al, 1988).

Há evidências suficientes demonstrando que glucocorticóides reprimem a expressão do seu próprio receptor. Este efeito é parcialmente causado por uma redução na proporção de transcrição do gene que codifica para GR e, parcialmente, por um "turnover" aumentado da proteína (Dong et al, 1988).

Em células humanas, foram descritas duas isoformas de GR: hGR α e hGR β . O receptor hGR β não se liga a agonistas ou antagonistas de glucocorticóides, encontrando-se primariamente no núcleo de células transfectadas, independente da administração de hormônio. Na ausência de hGR α , hGR β é transcricionalmente inativo, entretanto quando ambas isoformas são expressas na mesma célula, hGR β inibe a estimulação da expressão gênica hormônio-induzida e mediada por hGR α . Portanto, parece funcionar como um dominante negativo inibindo a atividade de hGR α (Oakley et al, 1996).

1.2. Estrutura do receptor de glicocorticóides (GR)

Análise das sequências de DNA dos receptores nucleares têm mostrado que eles são compostos por uma série de domínios conservados (Figura 1A; Beato, et al, 1995).

O domínio de ligação à DNA (DBD), localizado centralmente, que permite a interação do receptor GR com as sequências de DNA contendo GREs. Este domínio é o mais altamente conservado, contendo 66-68 aminoácidos composto de dois dedos de zinco ("zinc fingers") que formam um domínio estrutural único. Três aminoácidos adjacentes ao "zinc finger", conhecidos como P-box, são críticos para o reconhecimento das sequências de DNA. Sub-famílias de receptores, incluindo GR, receptores de progesterona, andrógenos e mineralocorticóides, contém Gly, Ser, Val no P-box e reconhecem elementos de resposta compostos por hexanucleotídeos com a sequência consenso AGAACA. Não obstante, análise estrutural dos complexos GR-GREs revelaram que o "loop" D, dentro do domínio de ligação a DNA, é responsável pela dimerização

Figura 1 - (A) Estrutura de GR: AF1 - domínio de transativação (N-terminal), AF2 - domínio de transativação C-terminal, DBD - domínio de ligação a DNA, LBD - domínio de ligação ao ligante. cilindros indicam porções α -hélice da proteína. Aminoácidos envolvidos na especificidade da ligação a DNA (P-Box) e dimerização (D-Box) estão indicados. (B) Mecanismos de regulação transcricional a partir de GREs de genes responsivos a glicocorticóides: Promotores regulados por GR ou AP-1 são ilustrados aqui contendo pelo menos dois sítios GREs ou AP-1. Na presença de um GRE palindrômico, o receptor dimerizado ativa transcrição, porém na presença de um nGRE (GRE negativo) o receptor reprime transcrição. A interferência de GR com AP-1 ocorre através da interação direta seguida da interação com co-ativadores ou componentes do complexo de iniciação de transcrição (CIT).

pós-ligação aos GREs. Mutações dentro desta região tem um efeito devastador sobre a ligação cooperativa a GREs palindrômicos, mas não abole completamente a ligação a DNA (Dahlman-Wright et al, 1991). O domínio de ligação ao hormônio (LBD) é o segundo mais conservado entre os receptores nucleares, sendo localizado na porção C-terminal. Além disso, o domínio de ligação ao hormônio contém regiões que controlam a regulação transcricional e a dimerização do receptor, que estabiliza a ligação DNA-receptor, a interação com a proteína hsp90 e a translocação nuclear. O domínio N-terminal (domínio de transativação; AF1) tem função menos clara. Ele esconde uma região acídica que é de importância para a transcrição (Godowski, 1988). Certas deleções dentro deste domínio, resultam em perda de 90% da sua função como definido pela resposta hormonal.

1.3. Regiões de DNA responsivas a glicocorticóides (GREs).

GR interage com sequências de DNA específicas nas regiões promotoras de genes responsivos a GC (Figura 1B). Tais sequências de DNA tem propriedades de "enhancers", os quais são responsivos ao hormônio. Os elementos de resposta a GC para os receptores esteróides tem sido caracterizados como dois hexanucleotídeos arranjados como um palíndromo imperfeito flanqueando três pares de bases centrais não conservados (Beato, 1989).

A imperfeição do GRE palindrômico TGTACANNNTGTTCT é encontrada no gene que codifica para aminotransferase de rato (Jantzen et al, 1987). Alterando o espaçamento entre os hexanucleotídeos ocorre rompimento da ligação dos receptores esteróides aos elementos de resposta palindrômicos. A ligação cooperativa do receptor de glicocorticóide ao elemento de resposta palindrômica é controlada pelo domínio de dimerização no segundo dedo de zinco do domínio de ligação ao DNA conhecido como D-box (Figura 1A). Na

ausência do ligante o receptor de glicocorticóide pode formar homodímeros em solução através do domínio de dimerização.

Duas grandes classes de GREs tem sido descritas. GREs simples: que contêm palíndromos imperfeitos ou hexâmeros separados por três bases (Beato, 1989) que são suficientes para a aumentar a transcrição de promotores vizinhos, sendo que, repressão não é observada de tais sítios. GREs compostos onde GR atua em colaboração com outros fatores que se ligam a sítios GRE que são deficitários em uma sequência consenso comum. Nestes sítios, GR pode aumentar ou diminuir a transcrição (Beato, 1989).

1.4. Regulação Gênica pelo Receptor de Glicocorticóides (GR)

GCs induzem a expressão de genes alvo, sendo os mais precocemente induzidos aqueles cuja indução é insensível a inibidores de síntese proteica. A análise dos primeiros genes regulados por GC que foram clonados, ou seja: o genoma do vírus do tumor mamário de camundongo e o gene que codifica para metalotioneína II_A humana, levaram à identificação dos primeiros elementos de resposta ao hormônio (GREs) que servem como elementos "enhancers" induzíveis e sítios de ligação a GR localizados nas regiões promotoras de genes alvo.

Embora foi descoberto que GC reprime a expressão de certos genes, o principal foco tem sido sobre genes positivamente regulados. Entre os genes induzidos por glicocorticóides estão aqueles que codificam para interleucina-1, receptor de insulina, hormônio de crescimento, uteroglobina de rato, tirosina aminotransferase, metalotioneínas I e II, glicoproteína α -1 ácida e o gene *env* de retrovírus endógeno (Beato et, 1989).

Os genes que codificam para proopiomelanocortina (POMC), a subunidade α de hormônios glicoproteicos, collagenase tipo I representam importantes alvos fisiológicos de GC. Além disso, repressão também foi verificada para os proto-oncogenes *c-myc*, *c-myb*, *c-Ki-ras*, os genes similares as

interleucinas JE e KC e interferon γ (Eastman-Recks & Vedeckis, 1986; Rameh & Armelin, 1992). A repressão da expressão do gene α é causada por interferência com o fator de transcrição CREB (Akerblom et al, 1988), enquanto a repressão da transcrição do gene que codifica para colagenase foi atribuída à interferência com o fator de transcrição AP-1 mediada por GR (Jonat et al, 1990; Yang-Yen et al, 1990; Figura 1A). A regulação negativa do gene de POMC, por sua vez é exercida através da interação direta de GR com seu promotor, que contém um GRE negativo (nGRE) (Drouin et al, 1993).

Embora, o mecanismo exato pelo qual GR interfere com CREB e AP-1 ainda não foi elucidado, é quase certo que não requer ligação direta a DNA. Mutações dentro do domínio de ligação a DNA ou substituições do DBD (domínio de ligação a DNA) por DBDs de outros fatores de transcrição, não abolem a capacidade de GR interferir com AP-1 (Yang-Yen et al, 1990).

De forma interessante, GRs defectivos para dimerização, gerados por mutações dentro do loop D, não ligam cooperativamente a GREs, mas podem ainda reprimir genes regulados por AP-1 (Heck et al, 1994).

Reichardt et al, (1998) obtiveram o *knock-in* de uma mutação pontual dentro do gene que codifica para GR, levando à substituição da alanina 458 por uma treonina. Esta substituição resulta em um GR defectivo para dimerização ($GR^{dim/dim}$) que não liga cooperativamente a GREs palindrômicos (Heck et al, 1994). Esses autores mostraram que camundongos $GR^{dim/dim}$ não mais respondem a GC com indução do mRNA correspondente à proteína TAT e apresentam grande redução na indutibilidade de genes repórter baseados em MMTV. Uma vez que camundongos $GR^{dim/dim}$ parecem relativamente normais e saudáveis sob condições de laboratório, o mais impressionante destes achados é que a ativação gênica mediada por GR não é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência. Esses mesmos resultados são surpreendentes pois os camundongos $GR^{-/-}$ morrem rapidamente depois do nascimento devido à falha

respiratória, pois seus pulmões não são maduros, faltando proteínas surfactantes. Além da deficiência na indução da expressão gênica mediada por GR, camundongos GR^{dim/dim} são deficientes na repressão de genes que são regulados através de nGREs, exibindo elevada expressão de POMC e prolactina (Drouin et al, 1993). A única regulação transcricional intacta nesses camundongos é a interferência transcricional com AP-1, reprimindo os genes para colagenase e gelatinase.

GR também afeta a atividade de NF- κ B e, pelo menos para células linfóides, esta inibição é baseada na indução de I κ B α , um inibidor específico de NF- κ B (discutido em Auphan et al, 1995; Carvalho & Armelin, 1997). Embora GC estimule a transcrição de I κ B α , não foi identificado até agora nenhum GRE responsável por esse efeito, o que sugere que a indução de I κ B α pode não depender de interação direta de GR ao DNA. Outra explicação para este fato pode ser a presença de GREs menos canônicos, como acontece para o promotor de *v-fos* de FBJ e FBR (Joazeiro & Armelin, 1990).

1.5. Co-ativadores e co-repressores de atividade transcricional de GR

O mecanismo de ação dos receptores nucleares oferece um claro exemplo de como modificações na estrutura da cromatina podem contribuir para o controle da expressão gênica. Uma visão atual da ação hormonal a nível transcricional, requer analisar a interação dos receptores hormonais, com outros fatores de transcrição dentro do contexto celular onde todas estas proteínas funcionam.

Os receptores nucleares são reconhecidos por recrutarem grandes complexos de proteína que contribuem reversivelmente, para estabilização ou desestabilização da cromatina.

O papel destes co-ativadores e co-repressores, mediando a atividades destes receptores nucleares dentro da cromatina, é um elemento chave na Endocrinologia contemporânea. O receptor de glucocorticóide reconhece

elementos de resposta (GREs) dentro dos nucleossomos como primeiro passo em direção ao rearranjo dos contatos histona-DNA concomitante com a reunião do complexo transcricional funcional.

A interação de diferentes vias de controle transcricional responsivas a receptores nucleares distintos tem sido reconhecida (Meyer et al, 1989). A capacidade de ativação de transcrição por um receptor nuclear comprometer a resposta transcricional dependente de um outro receptor, implica que componentes da maquinaria transcricional são compartilhados.

Co-ativadores podem ser divididos em duas classes gerais: a família SWI/SNF e a família de histona acetil transferases. Ambas as classes de ativadores tem a capacidade de modificar o ambiente da cromatina, facilitando a transcrição indiretamente. Eles podem, potencialmente, influenciar diretamente a atividade da maquinaria de transcrição basal, através de contatos proteína-proteína. A família SWI/SNF foi primeiro caracterizada como reguladores da expressão gênica na levedura *Sacharomyces cerevisiae* (Stern et al, 1984).

A ativação transcricional dependente do ligante promovida por GR em levedura, foi facilitada por diversos produtos gênicos SWI tais como SWI1p, SWI2p e SWI3p (Yoshinaga et al, 1992). Todos estes são componentes de um grande complexo de remodelamento da cromatina (Peterson et al, 1994). A afinidade do complexo SWI/SNF por GR poderia ser explicada pela presença de motivos de ligação ao receptor (LXXLL) em SWI1p (Heery et al, 1997). O gene Brahma (Brm) de *Drosophila* codifica uma proteína altamente similar em nível de sequência a SwI2p. Brahma é necessária para o controle de diversos genes homeóticos que definem a segmentação do embrião de *Drosophila* durante o desenvolvimento. Não é conhecido se Brahma é necessária para a regulação transcricional por diversos membros da super-família de receptores nucleares encontrados em *Drosophila*. A proteína Brahma é reunida em um grande complexo que inclui diversas outras proteínas que são homólogas das proteínas SWI/SNF em levedura (Papoulas et al, 1998). O complexo

equivalente em mamíferos, tem uma composição similar em subunidades, similar, na qual o homólogo de SWI2p é codificada por BRG-1 (Brahma-related gene 1 (Zhao et al, 1998). BRG-1 humano e as proteínas relacionadas, interagem com receptores nucleares em células de mamíferos (Chiba et al, 1994). Estas interações têm consequências funcionais para o remodelamento da cromatina, que é necessário para a ação do receptor de glucocorticóide.

Histona acetil-transferases (revisto em Torchia et al, 1998), foram inicialmente identificadas com base na sua interação com o domínio de ligação ao ligante de uma variedade de receptores nucleares na presença de ligantes receptores cognatos com estudos subsequentes revelando sua atividade de histona acetil transferase (HAT) (Spencer et al, 1997). O grupo melhor caracterizado de co-ativadores HAT, talvez seja a família p160, na qual variações múltiplas tem sido isoladas com altos níveis de similaridade. Até o momento, três membros diferentes da família p160 existem como variantes originados por splicing diferencial: SRC-1/NcoA-1, TIF2/GRIP1/NCoA2 e ATCTR/RAC3/AIB1/TRAM-1 (Onate et al, 1995; Hong et al, 1996). SRC-1 também recruta outras acetil-transferases incluindo p300, CPB (proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP e PCAF. p300 e CBP podem aumentar a atividade transcricional dependente do ligante em sinergismo com SRC-1 (Smith et al, 1996). p300, CBP e SRC-1 também interagem, independentemente, com PCAF, sugerindo que uma grande quantidade de histona acetil-transferases pode ser reunida na vizinhança de um receptor ativado pelo seu ligante específico.

1.6. Fosforilação de GR

Os receptores dos hormônios esteróides são todos fosforilados e sofrem hiper-fosforilação dependente do hormônio. A maioria dos sítios fosforilados estão no domínio amino-terminal, muitos dos quais dentro da região de transativação. Todos os sítios são ocupados por serinas, exceto por uma

treonina no receptor de glicocorticóide de camundongo. Tais sítios são frequentemente fosforilados por quinases associadas ao ciclo celular como quinases dependentes de ciclinas e MAP quinases. A fosforilação de um receptor particular parece ser independente da célula na qual ele é expresso, sugerindo que a fosforilação é uma propriedade intrínseca do próprio receptor. Assim, por exemplo, GRs de camundongo são fosforilados nos mesmos sítios quando expressos endogenamente em células WEHI-7 de timoma ou super-expressos em células CHO (Bodwell et al, 1991).

A fosforilação de GR significativamente aumenta sua atividade de transativação (revisto em Bodwell et al, 1998). Esse dado alinha GR com outros esteróides cuja atividade de transativação aumenta quando fosforilados. A fosforilação também aumenta a trans-repressão do próprio gene que codifica para GR e diminui seus níveis proteicos. A fosforilação, desestabiliza grandemente GRs, presumivelmente, por aumentar a suscetibilidade à degradação proteolítica. Tal efeito de fosforilação tem sido observado, também, em outras proteínas. A fosforilação de GR pode ser importante para o "turnover" normal da proteína. A hiper-fosforilação induzida pelo hormônio pode ter funções adicionais (Bodwell et al, 1993).

Entre os hormônios esteróides, apenas os glucocorticóides têm sido estudados extensamente para determinar se sua atividade na célula-alvo depende da fase do ciclo celular. Estudos iniciais com células sincronizadas mostraram que linhagens celulares com GRs endógenos são geralmente sensíveis a GC em G1 tardio e S, mas resistentes em G2, M e início de G1 (revisto em Bodwell et al, 1998).

A região amino-terminal de GR, onde a maioria das fosforilações ocorre, é negativamente carregada e reduz a ligação inespecífica de GR a DNA. A hiperfosforilação aumenta a carga negativa na fase S, o que poderia reduzir a ligação não específica e facilitar a procura por sítios específicos no genoma (Bodwell et al, 1993).

Por outro lado, mudanças na fosforilação de GR através do ciclo, são responsáveis por mudanças na sensibilidade a glucocorticóides.

1.7. O efeito anti-tumoral dos glicocorticóides

Os hormônios esteróides são reguladores essenciais do crescimento celular normal, diferenciação, e homeotase (Walshia & Avashia, 1992 apud Vivanco et al, 1995). Assim, por exemplo, estrógenos and andrógenos podem funcionar como mitógenos potentes enquanto desempenham funções críticas na diferenciação (Jordan and Morrow, 1993 apud Vivanco et al, 1995), enquanto glicocorticóides tendem a promover diferenciação e inibir proliferação. Esteróides são comumente usados em terapia por seus efeitos imunossupressivos, anti-inflamatórios, citostáticos (em algumas células) e anti-tumorais. Assim, por exemplo, GCs de uso tópico reduzem destruição tecidual em certas desordens de pele por inibir collagenase tipo IV (Oikarinen et al, 1993). São elementos-chave na terapia da artrite reumatóide, doenças de colágeno, leucemia linfática e linfomas (Parillo & Fauce, 1979, Haynes, 1990 apud Helmberg et al, 1995).

Os glicocorticóides inibem o crescimento de tumores induzidos por carcinógenos, em pulmão de camundongo (Droms et al, 1993), pele de camundongo (Strawhecker & Pelling, 1992) e cólon de rato (Denis et al, 1992). Entretanto, GCs aumentam significativamente a transformação de células epiteliais humanas cultivadas por vírus de sarcoma murino de Kirsten (Durst et al, 1989) e ativam fortemente a transcrição gênica de MMTV e produção de vírus (Truss & Beato, 1993). A interação funcional de receptores intracelulares com AP-1, junto aos efeitos estabelecidos de esteróides, levanta a hipótese de que certas atividades do receptor podem diferir em células normais e immortalizadas em geral, ou mesmo, contribuir para a progressão do fibrosarcoma (Vivanco et al, 1995).

A despeito da sua importância, seu uso é largamente empírico, e os mecanismos que medeiam os efeitos benéficos são pobremente conhecidos (Haynes, 1990 apud Helmberg et al, 1995). O mecanismo subjacente pode ser a indução de morte celular programada (apoptose). De fato, foi descrito que GCs matam timócitos imaturos por apoptose (Cohen, 1989 apud Helmberg et al, 1995).

Do mesmo modo, diversas linhagens leucêmicas, também sofrem morte celular em resposta a GC (Norman et al, 1977). Adicionalmente, GCs são indutores de apoptose em timócitos maduros, ativados e linfócitos T periféricos. (Galili, 1983). Consequentemente, a indução da apoptose pode ser um dos mecanismos-chave mediadores dos efeitos terapêuticos dos GCs no tratamento de leucemias, linfomas e várias desordens auto-imunes. O receptor de GC é requerido para a apoptose induzida por GC (Baxter et al, 1971), mas os domínios de GR necessários para a indução da apoptose são controversos (Dieken & Miesfeld, 1992). A inibição da proliferação celular parece ser um dos mecanismos que poderia mediar os efeitos apoptóticos de GC. Esta hipótese foi baseada não somente na capacidade de GR inibir a atividade de AP-1, mas também, do conhecido envolvimento de AP-1 na proliferação celular (Vivanco et al, 1995).

1.8. O sistema celular ST1/P7

O fenômeno da reversão de células ST1 transformadas e tumorais para um fenótipo normal, tem permitido abordar a análise do papel de oncogenes e de genes supressores de tumor, não somente na transformação celular, mas também no controle da proliferação celular normal e nos mecanismos de transdução de sinal.

A linhagem celular C6 (Benda et al, 1968), foi estabelecida, em cultura, a partir de um glioma quimicamente induzido por N-nitrosometiluréia. Diversos

clones celulares foram derivados da linhagem celular C6 e caracterizados por sua capacidade de crescimento em resposta ao tratamento com hormônios glicocorticóides, fatores peptídicos de crescimento e soro (Armelin et al, 1983). Foi verificado que hidrocortisona inibe o crescimento do clone celular ST1 em monocamada, reduzindo a velocidade de crescimento e a densidade de saturação. Após 14-15 horas da adição de hidrocortisona, o tempo de dobramento das células ST1 aumenta de 15 para 24 h. Este efeito hormonal foi mapeado no ciclo celular, ocorrendo, exclusivamente, na fase G1 do ciclo celular (Armelin et al, 1983). Além disso, Hy restaura reversivelmente a dependência de soro, densidade, ancoragem e suprime a formação de tumores em camundongos *nude*, caracterizando uma reversão fenotípica tumoral-normal completa tanto "in vitro", como "in vivo". (Armelin & Armelin, 1978). Em contrapartida, o clone celular P7 se mostra resistente ao tratamento com o hormônio em culturas mantidas em monocamada e, também, em suspensão de agarose, sendo incapaz de apresentar a reversão do fenótipo tumoral para o fenótipo normal na presença de Hy.

Uma vez que a reversão fenotípica de células ST1, promovida por Hy, pode revelar genes que estão atuando como supressores de tumor, a clonagem de genes envolvidos neste processo, foi alvo do presente trabalho, realizado através da construção e análise de bibliotecas normalizadas de cDNAs subtraídos.

1.9. Análise da expressão diferencial de genes por subtração de cDNAs

Diferentes métodos tem sido utilizados para a identificação de genes diferencialmente expressos em vários tipos celulares, submetidos a diversas condições fisiológicas. Dentre estes destacam-se: hibridização subtrativa (Duguid & Dinauer, 1990), "differential-display" RT-PCR (Liang & Pardee, 1992), análise por representação diferencial de cDNAs (RDA) (Hubank & Schatz, 1994), análise da expressão gênica em série (SAGE, Velculescu et al, 1995), e mais recentemente a análise simulatânea da expressão de um grande

número de genes através de micro-arranjos de cDNAs (Skena et al, 1995; Derisi et al, 1996).

Há diversos protocolos para hibridização subtrativa de cDNAs, mas o princípio tem permanecido o mesmo. Em geral, cDNAs de células alvo ("tester") são hibridizados com um vasto excesso molar de cDNAs controle ("driver"), seguido de separação dos cDNAs de fita simples (correspondendo aos genes diferencialmente expressos) dos híbridos de fita dupla, através da cromatografia em colunas de hidroxiapatita. Desde então, várias melhorias no método original foram obtidas a partir da aplicação da reação de amplificação de DNA em cadeia pela polimerase (PCR), tais como: a possibilidade de produzir vasta quantidade de cDNA "driver" a ser utilizado durante os métodos de subtração física, e a recuperação e enriquecimento do produto final nas subtrações com um extenso número de ciclos.

As etapas mais difíceis na metodologia de subtração de cDNAs possivelmente são a separação dos híbridos das moléculas de cDNA fita simples e a variação na eficiência de subtração de cada sequência em particular. Dentre estas etapas, a segunda seguramente responde pela presença da maioria das sequências indesejáveis nas bibliotecas subtraídas.

Entre as melhorias para a eficiência de separação entre híbridos e moléculas cDNAs fita simples, está o emprego da afinidade entre biotina e estreptavidina. O sucesso na combinação destas duas técnicas foi descrito por Duguid et al, 1988; Duguid & Dinauer, 1990; Hara et al, 1991).

Mais recentemente, a supressão por PCR (Siebert et al, 1995), tem permitido a eliminação do processo de separação física entre os híbridos e os cDNAs de fita simples e a consequente recuperação das sequências-alvo após uma etapa de amplificação de forma rápida. Sua utilização tem sido permitida por uma combinação entre duas metodologias: a subtração de cDNAs e a representação diferencial de genes (RDA) (Gurskaya et al, 1996; Tchernitsa, et al, 1999). Neste método, as populações de cDNAs são clivadas com *Rsa* I para

gerar amplicons que serão subtraídos e facilmente amplificados por PCR. Antes de efetuar a primeira hibridização, as populações de cDNAs clivados são ligadas a dois adaptadores de cDNA, que possuem repetições invertidas na sua sequência. Após hibridização, os fragmentos que resultam flanqueados por um mesmo adaptador nas duas extremidades formarão estruturas "pan-like" após cada paço de desnaturação, devido à presença de repetições invertidas. Estas estruturas são mais estáveis do que o híbrido "primer-template" e, consequentemente, suprimem amplificação exponencial. Desta forma, apenas os hetero-híbridos subtraídos são selecionados pela amplificação por PCR.

Em vista do potencial e da praticidade desta tecnologia, decidiu-se adotá-la para atingir os objetivos propostos neste trabalho.

1.10. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Identificar genes regulados pelo glicocorticóide hidrocortisona, na linhagem celular ST1, a fim de compreender o fenômeno da reversão fenotípica tumoral-normal induzido por este hormônio neste modelo celular.

Objetivos específicos:

Construir bibliotecas normalizadas de cDNA subtraídos, utilizando-se como "tester", amostras de mRNA de células ST1 tratadas com Hy e/ou Hy e Chx através da metodologia de PCR supressivo.

Analisar a composição das bibliotecas construídas no item anterior por sequenciamento de DNA e confirmar a expressão diferencial dos mRNAs correspondentes por Northern blot.

Obter e caracterizar cDNAs completos para as sequências diferencialmente expressas obtidas no item anterior com o objetivo final de avaliar sua contribuição para a reversão fenotípica tumoral-normal de células ST1 na presença de Hy.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Soluções para cultura de bactérias

2.1.1.1. Meio LB (Luria-Bertani): Triptona 10g/l; extrato de levedura 5g/l e NaCl 10g/l, pH 7,5. Para o preparo do meio sólido em placas, adicionou-se agar 1,7g/l.

2.1.1.2. Ampicilina: A solução estoque foi feita 20mg/ml, filtrada em filtros Milipore 0,2 μ m e estocada na geladeira.

2.1.2. Plasmídeos

2.1.2.1. pBluescript KS(-) (Stratagene, La Jolla, CA, USA): vetor plasmidial.

2.1.2.2. pCM: vetor retroviral contendo porção retroviral do vetor MSCVneo e esqueleto do vetor pCLNCX (Naviaux et al, 1996).

2.1.2.3. 8B8pCM: vetor retroviral que contém o cDNA que codifica para TN-X das células ST1 de rato.

2.1.2.4. 8BpBS1: vetor pBluescript contendo o cDNA 8B subclonado a partir do clone retroviral 8B8pCM.

2.1.2.5. 8BG: vetor plasmidial pBluescript contendo o fragmento de 3,5 kb *Not* I/*Sma* I do clone 8BpBS1.

8Bg: vetor plasmidial pBluescript contendo o fragmento de 2 kb *Not* I/ *Sma* I do clone 8BpBS1.

2.1.2.6. ST1HYC-28: vetor pBluescript contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente a porção fn3 (fibronectina tipo III) de TN-X.

2.1.2.7. ST1HYC-24: vetor pBluescript contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente ao exon I do proto-oncogene *sno* de células ST1.

- 2.1.2.8. ST1HY24-9:** vetor pUC18 contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente a trombospondina-1 de células ST1.
- 2.1.2.9. ST1HY24-20:** vetor pUC18 contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente a ciclina G de células ST1.
- 2.1.2.10. ST1HY24-39:** vetor pUC18 contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente a folistatina de células ST1.
- 2.1.2.11. ST1HY24-60:** vetor pUC18 contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente a tirosina fosfatase CL100 de células ST1.
- 2.1.2.12. ST1HY24-85:** vetor pUC18 contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente ao gene NRP/B de células ST1.
- 2.1.2.13. ST1HY24-136:** vetor pUC18 contendo o fragmento de cDNA subtraído correspondente a subunidade catalítica da fosfatase 2A de células ST1.

2.1.3. Oligonucleotídeos

- 2.1.3.1. Primer Universal :** 5'- TTTCCCAGTCACGACGTTGTA – 3'
- 2.1.3.2. Primer Reverso:** 5'- CAGGAAACAGCTATGAC – 3'
- 2.1.3.3. Primer olig-dT:** 5'- TTTTGTACAAGCTT₃₀ – 3'
- 2.1.3.4. PCR primer 1:** 5'- CTAATACGACTCACTATAGGGC – 3'
- 2.1.3.5. PCR primer 2:** 5'- TGTAGCGTGAAGACGACAGAA – 3'
- 2.1.3.6. Nested primer 1:** 5'- TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT – 3'
- 2.1.3.7. Nested primer 2:** 5'- AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT – 3'
- 2.1.3.8. GAPDH 5':** 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC – 3'
- 2.1.3.9. GAPDH 3':** 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA – 3'
- 2.1.3.10. GAPDHM1:** 5'- ACCACAGTCCATGCCATCACTGTTATA CAGGGAGATGAAA – 3'
- 2.1.3.11. GAPDHM2:** 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTATCTGTCA ATGCAGTTTGTAG – 3'
- 2.1.3.12. SNOM1:** 5'- AGGAACTGAGAACAACATGCCCCGA AGTGAAATCTCCTCCG – 3'

2.1.3.13. SNOM2:5'-

TAGACTCCCCTTCCAAACAGTGGGACAAGATACTC
ATCTGC – 3'

2.1.3.14. 24T3: 5'- AGGAACTGAGAACAACATGCC – 3'**2.1.3.15. 24T7: 5'- TAGACTCCCCTTCCAAAACAGT – 3'****2.1.4. Linhagens de células de mamíferos**

2.1.4.1. ST1: derivado da linhagem celular C6 de glioma de rato hipersensível a glicocorticóides (Armelin et al, 1982; Armelin, et al., 1983).

2.1.4.2. P7: derivado da linhagem celular C6 de glioma de rato resistente ao tratamento com glicocorticóides.

2.1.4.3. U87: linhagem de glioblastoma humano (astrocitoma de grau III) cedido pela Dra. Eugenia Constanzi (ICB-USP).

2.1.5. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos

2.1.5.1. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium"): GIBCO-BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA.

2.1.5.2. Soro fetal bovino: CULTILAB Materiais para cultura de células.

2.1.5.3. PBSA: (Phosphate Buffered Saline): solução salina tamponada em pH 7,2 composta de 140mM NaCl; 2,7 mM KCL; 8mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄.

2.1.5.4. Tripsina: Gibco Limited, Scotland, UK.

2.1.5.5. Isótopos radioativos: [α -³²P]dCTP 3.000Ci/mmol, e [γ -³²P]ATP 3.000Ci/mmol foram obtidos de New England Nuclear, Boston, USA.

2.1.5.6. Soluções de lavagem para purificação de mRNA:

2.1.5.6.1 Solução I : 10mM Tris-Cl pH 7,5; 1mM EDTA; 500mM NaCl.

2.1.5.6.2 Solução II: 10mM Tris-Cl pH 7,5; 1mM EDTA; 100mM NaCl.

2.1.5.6.3 Solução de eluição: 10mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA

2.1.5.7. **Solução de lise para RNA:** Isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sódio 25mM pH 7,0 e β -mercaptoetanol 100mM.

2.1.6. Tampões para eletroforese e outros

2.1.6.1. **TAE:** Solução estoque foi feita 10X concentrada (400 mM Tris-acetato, 10 mM EDTA).

2.1.6.2. **TE:** 10 mM Tris-Cl pH8,0 e 1 mM EDTA pH8,0.

2.1.6.3. **TEB:** Solução estoque foi feita 10X concentrada (900 mM Tris-borato e 10 mM EDTA).

2.1.6.4. **Poliacrilamida:** Solução estoque 32% acrilamida; 1,8% N,N'-metileno-bis-acrilamida, filtrada e estocada em geladeira.

2.1.6.5. **Persulfato de amônio:** Solução de trabalho 10%, estocada em geladeira.

2.1.6.6. **TEMED** (N,N,N',N'-tetrametileno etileno diamina): Sigma (St. Louis, USA).

2.1.6.7. **Tampão de hibridização para subtração:** Clontech (Palo Alto, CA, USA).

2.1.6.8. **Tampão de corrida para gel de agarose alcalino:** 20mM NaOH; 20% glicerol; 0,025% azul de bromofenol.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Cultura de células e tratamento com hidrocortisona e/ou cicloheximida.

Culturas de células ST1 (2.1.4.1), P7 (2.1.4.2) e U87 (2.1.4.3) foram mantidas em frascos plásticos descartáveis contendo meio de cultura DME suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1,2g/l de bicarbonato de sódio, 25mg/l de ampicilina e 100mg/ml de estreptomicina, a 37°C e 2% de CO₂. As células foram cultivadas sempre que atingida uma densidade próxima à saturação, utilizando-se tripsina 0,1% em PBSA (2.1.5.2). Os estoques celulares foram mantidos congelados no meio de cultivo contendo 10% de DMSO, a -190°C, em tanques de nitrogênio líquido. O tratamento das células com hidrocortisona (100ng/ml) ou cicloheximida (10µg/ml) foi feito em culturas sub-confluentes.

2.2.2. Extração e purificação de RNA total (Chirgwin et al, 1979).

As células foram mantidas em culturas sub-confluentes e tratadas com hidrocortisona (100ng/ml) e/ou cicloheximida (10µg/ml) por diversos períodos de tempo. Ao final do tratamento, o meio de cultura foi removido, as culturas foram lavadas com PBSA (2.1.5.2.) e as células lisadas com solução de lise (2.1.5.7.). O material lisado foi coletado com policial de borracha e transferido para tubos de polialômeros contendo solução de cloreto de cézio 5,7M; acetato de sódio 25mM pH 5,0 e centrifugados a 130.000xg durante 17h a 20°C. O RNA sedimentado foi dissolvido em água e a concentração foi determinada pela absorbância da preparação a 260nm, utilizando como valor padrão 1 OD_{Abs}_{260nm} = 40µg de RNA por ml.

2.2.3. Purificação de RNA poliA⁺.

RNA poliA⁺ foi purificado diretamente a partir do lisado de células utilizando-se o kit Quick Prep micro mRNA purification (Amersham Pharmacia Biotech). As culturas de células foram lisadas com uma solução tamponada de isotiocianato de guanidina e N-lauril sarcosil. O lisado resultante foi então dissolvido com o dobro de volume de TE pH 7,5 (2.1.6.2), clarificado por centrifugação durante 5' a 14.000 rpm. O sobrenadante não viscoso foi salvo e misturado por agitação lenta com uma solução de oligo (dT)-celulose 25mg/ml. Após 5' de incubação, a resina foi centrifugada 5" e o sobrenadante desprezado. O "pellet" resultante, foi então lavado e centrifugado, como anteriormente, 4 vezes sucessivas com as soluções I (2.1.5.6.1) e II (2.1.5.6.2). Ao final das lavagens, o RNA foi eluído da resina com TE pH 7,5 (2.1.6.2) e quantificado por espectrofotometria como no item anterior.

2.2.4. Síntese de cDNAs dupla fita.

As sínteses da primeira e da segunda fita de cDNAs foram feitas pelo kit PCR Select cDNA subtraction (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). 2µg de RNA poliA⁺ foram aquecidas a 70°C na presença de 1µmol de primer de oligo-dT (2.1.3.3) por 2 minutos e transferido para banho de gelo. Após incubação por 2 minutos, foram adicionados, tampão de primera fita 5X concentrado, dNTPs 10mM e transcriptase reversa MMLV (200U/µl). A reação foi incubada por 1,5 h a 42°C. Após o término, a reação foi transferida para o gelo e o volume aumentado, para adição das enzimas necessárias para a síntese da segunda fita, na presença de tampão de segunda fita 5X concentrado, dNTPs 10 mM e água. A reação foi incubada a 16°C durante 2h. O cDNA resultante foi então purificado pela adição de fenol-clorofórmio, clorofórmio e precipitada pela adição de 0,5 volume de acetato de amônio 4M e 2,5 volumes de etanol absoluto e o "pellet" dissolvido em 50µl de água.

2.2.5. Eletroforese em géis de agarose e gel de agarose alcalino.

Géis de agarose foram preparados na presença de TAE (2.1.6.1) 1X concentrado conforme Sambrook et al, (1989) e utilizados para análise e purificação de fragmentos de DNA.

As amostras das reações de síntese dos cDNAs foram fracionadas no gel de agarose alcalino contendo NaOH e EDTA para a concentração final de 50mM e 1mM, respectivamente, na presença de tampão de corrida para gel alcalino 1X concentrado (2.1.6.8). Após adição de igual volume de tampão de amostra alcalino 2X concentrado, as amostras foram fracionadas em 7,5V/cm até o ponto desejado. O gel foi então lavado em TCA 7% a temperatura ambiente por 30 minutos, transferido para um pedaço de papel Whatman 3MM, seco em secador de gel e revelado por autoradiografia.

2.2.6. Clivagem com enzimas de restrição

As clivagens para obtenção dos amplicons a serem subtraídos foram feitas com 5 U de *Rsa* I (Clontech) por μ g de DNA. Análises de clones da biblioteca ST1-LA, foram feitas por clivagem com 5U de *Not* I (Promega) por μ g de DNA. As clivagens foram feitas de acordo com as instruções dos fabricantes.

2.2.7. Ligação de DNA e transformação de *Escherichia coli* XL1 Blue MRF'.

Ligações coesivas foram incubadas a 16°C na presença de 1mM rATP e 0,1 U de T4 DNA ligase por 16-18 h. Ligações não-coesivas foram conduzidas igualmente, a 16°C, porém, variando de 1 a 20 U de T4 DNA ligase. Os produtos de ligação foram diluídos 1:5 e usados para a transformação de bactérias *Escherichia coli* XL1 Blue MRF'. As células competentes, obtidas pelo tratamento com 100 mM CaCl₂, foram misturadas com aliquotas das ligações diluídas e incubadas no gelo por 30'. Após choque térmico a 42°C, as bactérias transformadas foram incubadas por 1h a 37°C sem antibiótico e, então,

plaqueadas em meio LB sólido (1,2% de agar) na presença de 75µg/ml de ampicilina.

2.2.8. Amplificação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Todas as reações de amplificação por PCR foram feitas na presença de tampão de *Taq* DNA polimerase 1X concentrado; 0,2mM de dNTP; 1U de *Taq* DNA polimerase e 1 pmol de cada primer num volume de 25µl, exceto quando mencionado.

2.2.9. RT-PCR competitivo

As sequências de primers para amplificação dos cDNAs correspondentes foram obtidas a partir das sequências determinadas de cada fragmento de DNA subtraído. As sínteses dos competidores para *sno* e GAPDH foram obtidas pelo kit PCR MIMIC construction (Clontech, Palo Alto, CA, USA). 2 ng do fragmento do gene *v-erb*, foram usadas para amplificação com primers compostos para *sno* (2.1.3.12 e 2.1.3.13), e GAPDH (2.1.3.10 e 2.1.3.11) durante 16 ciclos de 94°C, 45"; 50°C, 45"; 72°C, 90". 5% do produto deste PCR foi, então, diluído em 200µl de água e 2µl desta diluição foram amplificados com primers *sno*-específicos (2.1.3.14 e 2.3.1.15) e GAPDH-específicos (2.1.3.8 e 2.1.3.9) durante 18 ciclos de 94°C, 30"; 52°C, 40"; 72°C ,1'. Os produtos de PCR foram purificados do gel usando-se o kit Bandiprep (Amersham Pharmacia Biotech) e quantificados em attomoles por microlitro. Aliquotas de cada competidor foram então diluídas para 100 attomol/µl em uma solução de 10µg/ml de glicogênio ultrapuro e estocadas a -20°C. Todas as diluições seguintes de 10 a 10⁻⁶ attomoles/µl para cada competidor foram então feitas em TE (2.1.6.2) contendo 10µg/ml de glicogênio ultra puro.

2.2.10. Minipreparações de DNA e sequenciamento de DNA dupla fita

Culturas de bactérias recombinantes foram inoculadas em meio LB contendo 75µg/ml de ampicilina. Após 16-18 horas de crescimento, minipreparações de DNA foram feitas pelo método de lise alcalina, usando-se o kit GFX Micro plasmid prep (Amersham Pharmacia Biotech). Aproximadamente 500 ng de cada minipreparação foram utilizadas para reações de sequenciamento pelo método de terminação em cadeia com o uso de dideoxinucleotídeos e Termosequenase (kit US78500, Amersham Pharmacia Biotech).

2.2.11. Fracionamento dos produtos subtraídos em gel de poliacrilamida.

Uma alíquota de 5 µl dos produtos de PCR secundário marcados radioativamente, foram fracionados em géis de poliacrilamida desnaturante (2.1.6.4) contendo 7M uréia, transferidos para filtros de papel Whatman 3MM e revelados por autoradiografia.

2.2.12. Preparações de DNA em média escala e deleções unidirecionais com Exo III.

Preparações de DNA plasmidial em média escala foram feitas por cromatografia de troca iônica através do kit CONCERT (Life Technologies, Gaithersburg, USA). Aproximadamente 10 µg de DNA foram clivadas com *Hind*III e posteriormente *Sma* I e purificadas. O "pellet" foi dissolvido em tampão de EXO III 1X e 65-130 U de EXO III (Life Technologies) foram adicionadas em temperaturas de 32 a 37°C. Alíquotas foram retiradas de 1 a 2' e incubadas no gelo em um tubo contendo tampão de nuclease S1 1X e 40-60 U de nuclease S1. Após transferência dos tubos para temperatura ambiente por 30

minutos, esta reação foi inativada e iniciada a reação de recircularização com T4 DNA ligase.

2.2.13. Northern blot e marcação de sondas radioativas

Amostras de 20µg de RNA total de culturas de células ST1, P7 e/ou U87 foram fracionadas em gel de agarose/formaldeído e transferidas para membranas de náilon por capilaridade. O RNA foi então fixado na membrana, por 2h a 80°C e hibridizado com os fragmentos de cDNA subtraídos, marcados radioativamente por "random priming", na presença de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 3.000Ci/mmol, durante 16-18h. Terminada a hibridização, as membranas foram lavadas em soluções de concentrações variadas de sal, até 0,2 X SSC; 0,1% SDS a 50°C e reveladas por autoradiografia.

2.2.14. Construção e rastreamento de uma biblioteca de cDNA de células ST1 no vetor retroviral pCM.

RNA poliA⁺ isolado de células ST1 tratadas com hidrocortisona (100ng/ml) e cicloheximida (10µg/ml) por 5h, foi utilizado para sintetizar cDNAs de dupla-fita, pelo método de Okayama e Berg, através do kit Superscript Choice System (Life Technologies). O cDNA resultante foi então purificado, preenchido com T4 DNA polimerase na presença de dNTPs, ligado a um adaptador *Eco* RI/*Not* I e fracionado, por tamanho, em um gel de agarose/TAE 1,2%. cDNAs até 2,3 kb foram recuperados do gel e ligados ao vetor pCM previamente clivado com *Eco* RI. A reação de ligação foi então utilizada para transformar *Escherichia coli* DH10B, por eletroporação, constituindo as sub-bibliotecas ST1-SA, -SB e -SC. cDNAs acima de 2,3 kb foram igualmente clonados no vetor pCM originando as sub-bibliotecas ST1-LA, -LB e -LC. Os transformantes, que são ampicilina-resistentes, foram recuperados, crescidos até DO 0,8 e utilizados para purificação de DNA plasmideal, através colunas Quiagen (Hilden, Germany). Para rastrear clones

recombinantes contendo os cDNAs de interesse, 10-20 ng da biblioteca ST1LA foram utilizados para transformar *Escherichia coli* JM109 por eletroporação. As colônias resultantes foram então transferidas para membranas de náilon e hibridizadas com o fragmento de 193 pb do clone ST1HYC-28 marcadas radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 3.000Ci/mmol. Após, hibridização as membranas foram lavadas em soluções salinas de concentração variável até 0,2X SSC; 0,1% SDS a 55°C e reveladas por autoradiografia.

2.2.15. Análise das sequências em bancos de dados

Análise das sequências dos fragmentos subtraídos foram feitas utilizando-se as bases de dados nr e dbEST através dos programas BLAST-N e BLAST-X. Os alinhamentos múltiplos entre a sequência do cDNA 8B e proteínas similares foram obtidas pelo programa CLUSTAL X.

2.2.16. Purificação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose.

Os fragmentos utilizados como sonda foram re-amplificados por PCR, usando-se os primers do vetor, fracionados em gel de agarose e purificados pelo kit GFX DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech). Os fragmentos de DNA purificados foram utilizados para marcação radioativa ou subclonagem.

3. RESULTADOS

3.1. Construção da biblioteca ST1HYC5 de cDNAs subtraídos, sintetizados a partir de RNAs extraídos de células ST1 tratadas com hidrocortisona e cicloheximida por 5h.

3.1.1. Síntese dos cDNAs "driver" e "tester".

Uma biblioteca normalizada de cDNAs subtraídos (ST1HYC5) foi construída a partir de mRNAs purificados a partir de células ST1, tratadas com hidrocortisona (100ng/ml) e cicloheximida (10µg/ml) por 5h, para a síntese do cDNA "tester" e de ST1 não tratada, para a síntese do cDNA "driver". O tempo de 5h foi escolhido por representar o início do bloqueio da entrada na fase S do ciclo celular verificado em populações de células ST1 em crescimento exponencial, quando tratadas com Hy. A adição de cicloheximida visou evitar a indução de genes que não são diretamente regulados pelo receptor de glicocorticóides (GR), e, ainda, a estabilização de RNAs mensageiros de alto turnover e baixa abundância, que podem corresponder a genes regulatórios de grande interesse para este trabalho.

As amostras de mRNA foram convertidas em cDNA, através de reações de transcrição reversa, utilizando-se Superscript II (Life Technologies, Gaithersburg, USA) e "primer" de oligo-dT, seguidas pela reação de síntese da segunda-fita pelo método de Okayama & Berg (1982). A eficiência de síntese dos cDNAs foi monitorada através da incorporação de [α -dCTP] ^{32}P 3.000Ci/mmol nas reações de segunda fita e posterior fracionamento em gel de agarose alcalino. Utilizando-se DNA de fago λ clivado com *Hind*III marcado radiativamente, pudemos observar um perfil de síntese de até 12 kb sugerindo uma ótima eficiência de síntese e integridade da amostra (*Figura 2*).

Figura 2 - Análise da eficiência de síntese do cDNA "tester" (a partir de amostras de mRNA de células ST1 tratadas com Hy + Chx por 5h) para a construção da biblioteca ST1HYC5 por eletroforese em gel de agarose alcalino. Uma aliquota de 10% da reação de síntese de primeira fita de cDNA foi incubada na presença de 50 μ Ci de dCTP 3.000 Ci/mmol durante o mesmo período de tempo. DNA de fago lambda clivado com *Hin* dIII foi marcado radioativamente com DNA polimerase I fragmento Klenow e utilizado como marcador de peso molecular. Após fracionamento, o gel foi lavado em TCA 7%, seco e autoradiografado.

3.1.2. Geração de amplicons e ligação aos adaptadores

O método de subtração de cDNAs utilizado neste trabalho baseia-se na utilização de duas metodologias diferentes: a representação diferencial de genes (RDA) e o PCR supressivo. Da primeira, vêm a idéia de gerar representações de cDNAs a serem subtraídos, reduzindo a complexidade da amostra através da clivagem com enzimas de restrição que reconhecem tetranucleotídeos na sequência de DNA tais como *Rsa* I. Desta forma, fragmentos de cDNAs de 0,2 a 2,0 kb podem ser utilizados durante o processo de subtração, tendo tamanho suficiente para serem recuperados através da amplificação por PCR. cDNAs "tester" and "driver" foram submetidos ao mesmo tratamento.

Após digestão por *Rsa* I, alíquotas de cDNAs "tester" clivados foram submetidos à reação de ligação com dois adaptadores diferentes, separadamente (adaptadores 1 e 2, Clontech, Palo Alto, CA). Estes adaptadores permitem a amplificação seletiva através do PCR supressivo. Concomitante à ligação dos cDNAs "tester" clivados aos adaptadores 1 e 2 separadamente, uma alíquota de 10% de cada uma das mesmas ligações foi retirada e misturada, constituindo uma terceira ligação (1c) na presença de ambos os adaptadores. Esta ligação foi utilizada para determinação da quantidade total de cDNA de GAPDH presente. Os produtos da ligação foram utilizados para subtração apenas quando um mínimo de 50% do GAPDH inicialmente presente, estava ligado aos adaptadores.

3.1.3. Análise da ligação aos adaptadores 1 e 2

A eficiência de ligação dos cDNAs aos adaptadores, foi medida pela amplificação de GAPDH, utilizando-se "primers" gene-específicos (item 2, sub-ítem 2.1.3.8 e 2.1.3.9) e "primers" que amplificam a partir das extremidades de cada adaptador (2.1.3.4 e 2.1.3.5). Após inativação das reações de ligação, alíquotas de 1µl de cada uma delas foi diluída em 200µl de água e utilizada para PCR, conforme mostrado na *quadro 1*. Como pode ser visto na *figura 3*, o

produto de PCR gerado entre os "primers" GAPDH 3' e PCR 1 ou 2 é um fragmento de 1,2 kb, (esperado para rato e camundongo), enquanto os "primers" GAPDH 5' e 3', amplificam apenas um fragmento de 0,45 kb. Uma breve incubação de 5 minutos a 75°C foi necessária para a geração dos sítios de anelamento para os "primers" 1 e 2, após a qual, seguiram-se 25 ciclos de 94°C por 30"; 65°C por 30"; 68°C por 120".

	1	2	3	4	5	
cDNA ST1HYC5-adaptador 1	1		-	-	-	
cDNA ST1HYC5-adaptador 2	-	1	-	-	-	
Ligação adaptadores 1 e 2	-	-	1	1	1	
Primer 5' GAPDH	-	-	-	-	1	
Primer 3' GAPDH	1	1	1	1	1	
PCR primer 1	1	-	1	-	-	
PCR primer 2	-	1	-	1	-	
	22	22	22	22	22	PCR mix

Quadro 1 - Esquema das reações de amplificação por PCR a partir das ligações descritas no item 3.1.2. PCR mix é composta de tampão de Taq DNA polimerase 1X, 0,2 mM dNTPs e 1U de Taq DNA polimerase (volumes indicados em μ l).

Figura 3 – Análise da eficiência de ligação dos adaptadores 1 e 2 ao cDNA tester (ST1HYC5). Aliquotas de 1 μ l de cada ligação, previamente diluídas 1:200, foram amplificadas por PCR conforme esquema demonstrado no quadro 1. 1) 2) 3) 4) e 5) correspondem aos mesmos números do esquema no quadro 1. 5 μ l foram analisados em gel de agarose/TAE 1 X. O marcador de peso molecular (M) utilizado foi 100 pb ladder (Amersham Pharmacia Biotech).

3.1.4. Subtração

Uma alíquota de 20% de cada ligação foi então misturada com aproximadamente 1µg de cDNA "driver", na presença de tampão de hibridização. Após desnaturação a 98°C por 1' e 30", a hibridização foi conduzida a 68°C por 7,5 horas. Durante este procedimento, grande parte das sequências "tester" que encontram complemento em "driver", formaram híbridos que deveriam ter sido gradualmente removidos da fração de cDNAs fita simples. Este processo obedece a cinética de hibridização de segunda ordem, o que, por sua vez, deve levar a uma normalização aproximada entre as moléculas abundantes e raras da fração fita simples. Terminado este processo, ambas reações foram misturadas entre si, na presença de uma segunda adição de cDNA driver (0,5µg) e incubadas novamente a 68°C por 16-20 horas. Durante esta etapa, a nova adição de "driver" retira o restante de moléculas não diferencialmente expressas pela formação de híbridos "tester-driver" levando a um enriquecimento das moléculas "tester" que permaneceram fita simples na primeira hibridização. Estas formarão, na sua maioria, hétero-híbridos porque estarão flanqueadas por adaptadores diferentes em cada extremidade e serão amplificadas especificamente através do PCR supressivo. Finalmente, a reação de subtração foi diluída, como descrito em Métodos, e uma alíquota de 1µl foi utilizada para amplificação com os "primers" 1 e 2 (PCR primário) (ver item 2, sub-itens 2.1.3.4 e 2.1.3.5). Para evitar sub-representação de cDNAs representando genes diferencialmente expressos na amostra subtraída diluída, quatro alíquotas diferentes foram utilizados para amplificação com os "primers" 1 e 2. Para enriquecer a presença de hétero-híbridos, 1µl de cada amplificação anterior foi diluída, misturada e quatro novas amplificações de 17 ciclos foram realizadas utilizando-se agora os "primers" do tipo nested 1 e 2 (PCR secundário) ver item 2, sub-itens 2.1.3.6 e 2.1.3.7). A análise do perfil de amplificação está descrita no item 1.5

3.1.5. Análise do perfil de amplificação das amostras subtraídas em gel de poli-acrilamida.

Uma comparação do perfil de amplificação das amostras subtraída e não-subtraída foi feito em gel de poliacrilamida desnaturante na tentativa de identificar bandas que estivessem enriquecidas na amostra subtraída em relação a amostra controle (não subtraída). Para tanto, alíquotas do PCR primário de cada uma das amostras foram amplificadas com os "primers" do tipo "nested" 1 e 2 (item 2, sub-itens 2.1.3.6 e 2.1.3.7) por 11, 14 e 17 ciclos na presença de $\alpha^{32}\text{P}$ -[dCTP] 3.000 Ci/mmol e fracionadas em gel de poli-acrilamida desnaturante. Uma extensa redução na quantidade de fragmentos observados pode ser visualizada na amostra subtraída, sugerindo que houve realmente boa redução das sequências presentes na mesma proporção nas populações "tester" e "driver". Além disso, bandas altamente enriquecidas depois da subtração, também puderam ser visualizadas na amostra subtraída, indicando possivelmente, fragmentos que tiveram alta eficiência de subtração. O resultado está mostrado na *figura 4*.

Figura 4 – Análise do perfil de amplificação das amostras subtraída e não subtraída em gel de poliacrilamida desnaturante. Aliquotas do PCR primário foram amplificadas com os primers nested 1 e 2 na presença de dCTP 3.000Ci/mmol, durante 11, 14 e 17 ciclos de PCR secundário. 5 µl de cada reação foram fracionados em gel de poliacrilamida desnaturante e após secagem, o resultado foi revelado por autoradiografia.

3.1.6. Análise da eficiência de subtração

A eficiência de subtração foi estimada pela análise da abundância de GAPDH na amostra subtraída e, também, na amostra não subtraída (proveniente da ligação 1c), como controle. 1µl dos produtos do PCR secundário de cada amostra foram diluídos 10X em água e utilizados para amplificação através de 18, 23, 28 e 33 ciclos de PCR. Aliquotas de cada reação foram fracionadas em gel de agarose 2%/TAE 1X corado com brometo de etídeo. O resultado é apresentado na *figura 5*. Uma extensa redução da abundância relativa de GAPDH pode ser verificada na amostra subtraída, ao contrário da amostra não-subtraída, na qual GAPDH pode ser visualizado entre 18 e 23 ciclos de PCR, sugerindo uma boa eficiência de subtração.

Figura 5 – Análise da eficiência de subtração nas amostras subtraída e não subtraída. Aliquotas do PCR secundário diluído foram utilizadas para analisar a abundância relativa de GAPDH na amostra subtraída (1-4) e não subtraída (5-8) por PCR usando-se primers específicos para GAPDH durante 18 ciclos (1 e 5), 23 ciclos (2 e 6), 28 ciclos (3 e 7) e 33 ciclos (4 e 8). Após fracionamento em gel de agarose 2% TAE, o gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado.

3.1.7. Clonagem da amostra subtraída no vetor pBluescript para gerar a biblioteca ST1HYC5.

Para a clonagem das amostras subtraídas, cinco reações independentes do PCR primário foram diluídas, misturadas e utilizadas para amplificação com os "nested primers" 1 e 2 (item 2, sub-itens 2.1.3.6 e 2.1.3.7). Uma mistura destas cinco reações do PCR secundário ("nested") foi feita e uma alíquota foi utilizada para clonagem em pBluescript, conforme descrito em Material e Métodos. Alíquotas da reação de ligação foram então utilizadas para transformar *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' e uma biblioteca de aproximadamente 5.000 clones foi obtida e denominada ST1HYC5. Os clones recombinantes resultantes foram analisados para a presença de insertos através de PCR de colônia utilizando-se os "primers" universal e reverso (**Figura 6**).

Figura 6 – Análise parcial de alguns clones recombinantes da biblioteca ST1HYC por colônia-PCR. Os produtos de PCR dos clones selecionados foram fracionados em gel de agarose 1,5%/TAE corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml). Os números representam a identificação de cada clone. O marcador de peso molecular (M), utilizado foi DNA ladder 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech). A seta no marcador corresponde a 0,8 kb.

3.1.8. Confirmação da expressão diferencial de clones da biblioteca ST1HYC5.

Vinte clones, representando fragmentos de DNA da maior parte dos tamanhos do perfil de amplificação da biblioteca, foram purificados e tiveram a sequência dos seus insertos determinada, como descrito em Métodos. A **Tabela 1** mostra as similaridades encontradas pelas análises de sequência obtidas pelo programa BLAST. Não pudemos verificar qualquer redundância entre as sequências dos clones analisados. Para testar quantos clones correspondiam a mRNAs diferencialmente expressos, os insertos de alguns clones foram purificados, marcados radioativamente e utilizados como sondas em Northern blot de amostras de RNA total de culturas de células ST1 tratadas por 5h com Hy e/ou Chx ou não tratadas. A **figura 7** mostra o resultado da análise da expressão de alguns clones por Northern blot. Concluimos que o clone ST1HYC5-28 é exclusivamente regulado por hidrocortisona (**Figura 7B**). A maioria dos outros clones foi confirmado apenas na presença de Chx. Três clones não puderam ser detectados através de Northern blot na presença ou ausência de hidrocortisona, mesmo utilizando-se 20 µg de RNA total (ST1HYC5-57, ST1HYC5-62, ST1HYC5-24). Consequentemente, estes foram considerados como correspondendo a mRNAs de baixa abundância, o que nos levou a estimar uma proporção entre mRNAs raros e abundantes de 1:4.

Figura 7 – Confirmação da expressão diferencial de clones da biblioteca ST1HYC5.

Northern blot de RNA total extraído de culturas de células ST1 em crescimento exponencial tratadas com hidrocortisona (Hy) (100ng/ml) e/ou cicloheximida (Chx) (10µg/ml), ou não tratadas (controle). 1) Controle (não tratada); 2) Hy + Chx; 3) Hy ; 4) Chx.

Os insertos de cada clone de cDNA subtraído foram purificados e marcados radioativamente e utilizados como sonda durante as hibridizações. A) ST1HYC5-62, B) ST1HYC5-28, C) ST1HYC5-54, D) ST1HYC5-47.

Tabela 1 – *Identificação dos clones selecionados da biblioteca ST1HYC5 por sequenciamento de DNA e comparação com bancos de sequências não redundantes pelo programa BLAST. (*) indicam sequências dos clones sequenciados neste trabalho e depositadas no Genbank. (próxima página).*

Identificação do clone	similaridade dbEST	informação adicional	similaridade Genbank	número de acesso Genbank
ST1HYC5-57	gb/BE116493.1	embrião total	Retrovirus tipo A	gb/U23776.1
ST1HYC5-17	EST 2466345		28S gb/AW600968	
ST1HYC5-19	EST gi 4034342	mama normal (ORESTES) Fapesp/ILPC	gene novo em câncer de fígado HNYAI	
ST1HYC5-24	EST gb368140.1	tumor metastático de pulmão	sno proto-oncogene	*AF112446
ST1HYC5-28			Tenascina-X	*AF112447
ST1HYC5-20	EST9162159 gbBE307286	Mam5	emb/X67813	SRP72
ST1HYC5-21	EST 6966259 gb/AW434952	- nada consta		
ST1HYC5-46	EST 3223646 gb/A1009814	pulmão de rato		nada consta
ST1HYC5-54	EST9904444 gb/BE624028	Proteína associada a clatrina 47KDa		AP-47
ST1HYC5-41	gb/A1236968	rat ovary	RT140 antígeno transmembrana de célula epitelial	gb/U92440.1
ST1HYC5-16	gb/A17900583		talina	emb/X56123
ST1HYC5-60	EST 3815961 gbA1232081	rim de rato		
ST1HYC5-61	EST 2826816 gb/A1786845	Glut5	Glut-5	dbj/D13871
ST1HYC5-26	EST6595221 gb/AW251630			
ST1HYC5-71	EST 8497761 gb/BE105659.1		dUTPase	gb/U64030.2
ST1HYC5-47	gb/BE127837.1		calciclina	gb/U31867.1
ST1HYC5-62	gb/AW889416	tumor de sistema nervoso (ORESTES) Fapesp/ILPC	A20	gb/U19463.1

3.1.9. Análise do clone ST1HYC5-28

O clone ST1HYC5-28 apresenta um RNA de aproximadamente 5,7 kb, como revelado pela análise de Northern blot, sendo sua sequência altamente similar a tenascina-X de camundongo e humano (*Figura 8A*). A sequência de DNA do inserto corresponde a metade de um dos muitos domínios repetidos imperfeitos de fibronectina tipo III, que compõe as proteínas dessa família. A análise cinética da expressão deste gene em células ST1 e P7 em crescimento exponencial na presença de 5% de soro fetal bovino, sugere um pico de expressão por volta de 4 a 5 h (*Figura 8B e C*).

Figura 8 – Análise do clone ST1HYC5-28. (A) Sequência nucleotídica do fragmento subtraído correspondente ao clone ST1HYC5-28 e alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos. (B) Cinética da expressão do gene correspondente ao clone ST1HYC5-28 em culturas de células ST1 crescendo exponencialmente tratadas com hidroclorona (100ng/ml) por diversos períodos de tempo.

3.1.10. Análise do clone ST1HYC5-24

A sequência do clone ST1HYC5-24 é altamente similar ao proto-oncogene *sno* (*Ski* related *novel*). O fragmento de cDNA subtraído corresponde ao primeiro exon do gene que compartilha a mesma sequência com todas as isoformas encontradas. Uma vez que não pudemos detectar o transcrito usando Northern blot feito com RNA total de culturas de células ST1, nós tentamos medir os níveis de expressão deste gene através de RT-PCR competitivo semi-quantitativo. Para gerar estas sequências competidoras, as sequências dos "primers" que amplificam o cDNA alvo (*sno*) foram adicionadas a um fragmento do gene *c-erb* (Clontech) utilizando "primers" compostos em uma reação de PCR. A estrutura desses "primers" e um breve esquema da reação são mostrados na **figura 9A**. Numa primeira etapa, esses "primers" amplificam o fragmento do gene *c-erb* através das sequências internas do "primer" composto. Após a geração deste produto, uma re-amplificação é feita utilizando os "primers" gene-específicos para a sequência-alvo e o produto anterior como molde, gerando uma sequência heteróloga, que contém as sequências para os "primers" que amplificam o gene alvo em suas extremidades. O perfil de amplificação destas reações está mostrado na **figura 9B e C**.

Os produtos de PCR do competidor foram purificados, quantificados e diluídos em glicogênio ultra puro para 100 amoles/ μ l, como descrito em Métodos. Para determinar a melhor quantidade de competidor a ser utilizada durante as reações de PCR, adotou-se de 10 a 10^{-6} amoles do competidor de *sno* (M1 a M8, **Figura 10A**). Como pôde ser observado, nas maiores quantidades de competidor utilizadas, nenhuma amplificação de *sno* é visível. Diminuindo-se a quantidade de competidor, ao redor de 10^{-2} amoles, amplificou-se quantidades muito aproximadas de *sno*. Diminuindo-se ainda mais a quantidade do competidor, apenas o cDNA de *sno* se torna visível.

Para determinar se havia regulação do gene *sno* após tratamento com Hy, amostras de 1µg de RNA total de células ST1 não tratadas e tratadas com hidrocortisona (100ng/ml) durante 2, 4, 8, 16 e 24h, foram utilizadas para reações de transcrição reversa, e em seguida, amplificadas, por PCR, usando-se 10^{-1} amoles de competidor na presença de dCTP 3.000Ci/mmol. Os produtos da reação foram fracionados em gel de poli-acrilamida desnaturante, secos e revelados em Phosphor Imager (**Figura 10B**)

A fim de normalizar os dados para a expressão de GAPDH, um competidor heterólogo de 350 pb, foi construído para GAPDH baseado, também, em um fragmento do gene *c-erb*, como anteriormente. Resultados consistentes foram obtidos, utilizando-se de 1 a 10 amoles de competidor de GAPDH para a determinação dos níveis de GAPDH. Uma diminuição de 3X foi encontrada após 16h de tratamento de Hy, seguida de um aumento até os níveis basais (controle) em 24h de Hy (**Figura 10B**).

Figura 9 - Construção de um competidor heterólogo para o proto-oncogene *sno*.

A) Estrutura dos "primers" compostos contendo sequências do gene *sno* e esquema utilizado para amplificar um fragmento do gene *c-erb*. Cada "primer" flanqueia uma pequena porção do fragmento de *c-erb*. B) Perfil de amplificação com os primers compostos (2.1.3.12 e 2.1.3.13). C) Perfil de amplificação com os primers que amplificam *sno* (2.1.3.14 e 2.1.3.15). O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb "ladder" (Amersham Pharmacia Biotech).

Figura 10 - Cinética de amplificação de sno em células ST1 tratadas com hidroclortisona. **A)** Amostras de RNA total de culturas de células ST1 tratadas com hidroclortisona (100ng/ml) por diversos periodos de tempo e não tratadas foram purificadas e tratadas com DNase I. Aproximadamente 1 μ g de RNA foram convertidos em cDNA e 10% da reação foram utilizados para amplificação por PCR na presença diversas quantidades do competidor de sno (10 a 10^{-6} amoles). **B)** As mesmas amostras de RNA foram então amplificadas novamente na presença de 10^{-1} amoles do competidor de sno e α^{32} P-dCTP 3.000 Ci/mmol e fracionadas em gel de poliacrilamida. Os resultados foram quantificados em STORM Phosphor Imager. Os dados foram normalizados para amplificação de GAPDH, amplificado na presença do competidor de GAPDH (10 amoles), considerando o tempo zero como 1 conforme o grau de expressão relativa.

3.2. Isolamento e caracterização de um cDNA similar a TN-X em células ST1.

Para o isolamento do cDNA completo correspondente ao clone ST1HYC5-28, bibliotecas de cDNAs de células ST1 foram construídas em um novo vetor retroviral (pCM) com o Dr. Claudio Antônio Pinho Joazeiro (Instituto Salk) em colaboração.

3.2.1. Construção do vetor retroviral pCM.

O vetor pCM foi construído pelo Dr. Claudio Joazeiro (Instituto Salk, EUA) através da combinação de características de dois vetores retrovirais previamente existentes: pCLNCX (Naviaux et al, 1996) e MSCVneo (Murine, Stem Cell Virus; Hawley et al, 1994). O fragmento de 2,8 kb *Kpn* I contendo a porção retroviral foi sub-clonada na porção esqueleto do vetor pCNCX, gerando o vetor híbrido pCM (*Figura 11*). A porção retroviral do vetor MSCVneo também possui um extenso sinal de empacotamento que contribui para o alto título viral.

Figura 11 – Construção do vetor de expressão retroviral pCM. O fragmento de 2,8 kb Kpn I contendo a porção retroviral do vetor MSCVneo foi sub-clonada na porção esqueleto do vetor pCLNCX (4,5 kb Kpn I) gerando o vetor híbrido pCM. ϕ - Sinal de empacotamento extendido; LTR - "long terminal repeat"; neo - gene marcador que codifica para neomicina fosfotransferase II; CMV – promotor de citomegalovírus.

3.2.2. Construção de bibliotecas de cDNA enriquecidas para insertos maiores que 2kb.

RNA poliA⁺ foi isolado de células ST1 tratadas com hidrocortisona (100ng/ml) e cicloheximida (10µg/ml) por 5h. Aproximadamente 2µg de mRNA foram utilizadas para a síntese de cDNA dupla-fita, utilizando-se oligo-dT como "primer" e Superscript II (Life Technologies). A reação de síntese da segunda fita de cDNA foi, então, obtida, com o kit Superscript Choice system (Life Technologies). A reação total de cDNA foi, então, fracionada em gel de agarose e duas regiões foram coletadas do gel: a primeira, de cDNAs de até 2,3 kb (S), e a segunda de cDNAs acima de 2,3 kb (L). DNAs de ambas as bandas foram recuperados do gel usando-se GeneClean (BIO 101) e submetidos à reação de ligação com o vetor pCM clivado com *Eco* RI. Os produtos da ligação foram então utilizados para transformar *Escherichia coli* DH10B por eletroporação gerando as bibliotecas ST1-LA (contendo cDNAs acima de 2,3 kb) e ST1-SA (contendo cDNAs de até 2,3 kb). As colônias resistentes foram coletadas em meio LB contendo ampicilina (75µg/ml), crescidas e submetidas a extração de plasmídeo utilizando-se Quiagen Maxi kit (Quiagen, Corp.).

3.2.3. Rastreamento da biblioteca "ST1-LA" utilizando-se o clone ST128HYC5 como sonda.

Uma alíquota de 10 ng da biblioteca "ST1-LA" foi utilizada para transformar JM109 resultando em, aproximadamente, 40.000 colônias. As colônias originais foram utilizadas para preparação de réplicas a serem submetidas à hibridização com o fragmento de 193 pb do clone ST1HYC5-28 marcado radioativamente. Dos trinta e sete clones "positivos" encontrados, apenas três revelaram a presença dos insertos com tamanho próximo ao do RNA mensageiro verificado em Northern blot, quando clivadas com *Not* I (clones 3LA, 7LA e 8B). O maior deles, o clone 8B, contendo um inserto de aproximadamente 5,5 kb, foi então escolhido para a determinação da sequência

completa do cDNA. O sequenciamento parcial deste clone com "primers" desenhados para as extremidades 5' e 3' do vetor pCM (ver Material e Métodos) revelou que uma extremidade continha a cauda poliA e, a outra, uma porção inicial que alinhava com motivos repetidos similares a fibronectina tipo III de tenascina X.

3.2.4. Obtenção e análise da sequência completa de nucleotídeos do cDNA 8B que codifica para TN-X.

Com o objetivo de determinar a sequência total do cDNA 8B, o fragmento de *Not* I de 5,5 kb do clone 8B8pCM, foi sub-clonado no vetor pBluescript (Stratagene), originando o clone 8BpBS1, para a obtenção de deleções unidirecionais com a enzima exonuclease III. Em seguida, o fragmento de DNA do clone 8BpBS1 foi sub-dividido em dois fragmentos menores de 3,5 e 2,0 kb por clivagem com *Sma* I, os quais após sub-clonagem, originaram os plasmídeos 8BG e 8Bg, respectivamente. Para determinar se algum sub-fragmento pequeno foi perdido pela clivagem com *Sma* I, uma alíquota do produto desta clivagem foi submetida à análise por Southern blot, utilizando-se o fragmento do cDNA 8B completo como sonda. O resultado mostrou que nenhum fragmento adicional, além dos anteriores de 2,5 e 2 kb, resulta desta clivagem. Cada um destes dois clones foi digerido primeiramente com *Hind*III e, em seguida, submetido à reação de preenchimento com dNTPs fosforotioato (Amersham Pharmacia Biotech) e DNA polimerase I fragmento Klenow, para impedir acesso da enzima Exo III à extremidade que continha o "primer" utilizado para o sequenciamento. Em seguida, a clivagem com *Sma* I foi feita, para gerar uma extremidade sensível à digestão por Exo III e iniciar as deleções. Conjuntos de 10 pontos de deleções para cada plasmídeo foram feitos, produzindo clones cujo tamanho diferia de 200 a 350 pb entre cada ponto. Deleções de tamanho desejado foram então recircularizadas, pelo uso de T4 DNA ligase e os produtos resultantes foram utilizados para transformação de *Escherichia coli* XL1 Blue MRF'.

A sequência dos clones deletados foi determinada utilizando-se o "primer" KS. Aproximadamente 100-150 pb de sobreposição entre os clones foi obtida. Alguns trechos foram obtidos, também, em ambas as fitas, para a resolução de dúvidas. A sequência nucleotídica e a sequência deduzida de aminoácidos estão mostradas na *figura 12*.

A análise da sequência de DNA pelo programa BLAST revelou 90% de identidade com cDNAs de TN-X de camundongo (emb/X73959.1), 81% humano (ref/NM 007116.1), 81% bovino (emb/Y11915.1) e 96% rato (gb/U24489.1). A localização do fragmento subtraído é mostrada sublinhada na *figura 12*.

A análise da sequência deduzida de aminoácidos pelo programa BLAST-X revelou que a sequência é 64% similar as TN-Xs de camundongo (dbg/BAA24436.1), 60% humano e 59% bovino (emb/CAA7267.1). A sequência contém aproximadamente 21 motivos repetidos similares a fibronectina tipo III e 1 motivo altamente conservado de similar a fibrinogênio localizado na porção C terminal.

O alinhamento múltiplo com as 5 proteínas TN-X mais similares foi feito pelo programa CLUSTAL X e está mostrado na *Figura 13*. Não foram identificados motivos EGF-like e héptide, característicos dos outros membros da família TN-X.

A sequência deduzida de aminoácidos também foi analisada no banco de domínios pfam (EMBL) pelo programa SMART (Schultz et al., 1998; 2000), mas foram encontradas apenas as cadeias beta e gama do fibrinogênio C (domínio FBG), domínios relacionados a fibrinogênio (FReDs) e domínios de fibronectina tipo III (fn3). Nenhuma sequência RGD foi localizada. Os resultados desta análise encontram-se na *Tabela 2*. Análises da sequência pelo programa Signal P (Smart/EMBL) também não encontraram nenhum peptídeo sinal.

Tabela 2 – *Motivos de proteínas encontrados na sequência do cDNA 8B pelo programa SMART utilizando o banco pFam.*

gln/Pfam/pfam 00147	fibrinogênio C cadeias beta e gama	3e-36
gln/Smart/FBG	Domínios relacionados a fibrinogênio (FReDs)	5e-30
gln/Pfam/pfam 00041	fn3, fibronectina tipo III	1e-50
gln/Pfam/pfam 00041	fn3, fibronectina tipo III	9e-04
gln/Pfam/pfam 00041	fn3, fibronectina tipo III	0,001

Figura 12 – Sequência nucleotídica e sequência deduzida de aminoácidos do cDNA 8B. A Análise da sequência deduzida de aminoácidos foi obtida pelos programas BLASTX e ORF Finder. A seta indica o provável início da porção codificante. O sítio provável de poliadenilação e a cauda poliA estão mostrados em negrito. A porção similar a fibrinogênio esta indicada em verde. O restante da sequência corresponde a motivos de fibronectina tipo III. O fragmento subtraído está sublinhado.

1
 GCGGCCGCTCGACGAGGCTGATGCTGACATAGTGGGTGTTGGCAGATGGAGGGACAGCAGTGTGGGAGAACAGGGAGCT
 GTGGTAGCCACCCTGATCAGGTTTTCCCTGCTTTCCACGGCCTTGATAGCTTTTAGTTTGTCTTTTAAATTTTTATT
 TTGTTAATTACTATTTTTTTGAGTCAGGGCGACGCTCTTGTAACCCTGCCTAGCCTGAACTCCTTACGCAGACCAGGTT
 GGCCTTGAATTAACAAAGATCTGCCTGCTTCTGCCTAGCGCTGGCTTAAAGCCTGTGGTGCCACACCCACAAGGCTCTG
 TTTTTTATAAAATGTCTTTATGTGGGGGACAGAGGACAGGAAAAGACCTAACTCATCCCTCTGTGTGTCCAGATTGAGA
 GGAGGGAAAGCTCCGACCACACAGGCGGTGCCACACGACTCCTGAGCCCCCTCCTAAGAAGCCCCCTC GGAGAGCT
 → L G E L
 GACCGTGACAGATGCCACCCCTGACTCCCTGAGCCTCTCCTGGACAGTCCCTGAGGGACAGTTTGACCAGTTTGTGATCC
 T V T D A T P D S L S L S W T V P E G Q F D Q F V I Q
 AGTACAAGAACGGGGATGGGCAGCCCAAGGTGGTGCAGGGTGCCAGGGTATGAGGACCAGGTCACCATCTCCGGCCTGGAG
 Y K N G D G Q P K V V R V P G Y E D Q V T I S G L E
 CCAGACCACAAGTATAAGATGAACCTGTATGGCATCCACAGCGGTGACGCTGTGGGCCCCGTGTCTTGACAGGCGTGACG
 P D H K Y K M N L Y G I H S G Q R V G P V S * Q A * R
 GCTGCAGAGGAAGAGCCCCCAGCCCCACAGAGCCAGCACAGAGGCCCCAGAGCCCACAGAGGCCCCAGAGCCCACCGA
 L Q R K S P P A P Q S P A Q R P Q S P Q R P Q S P P R
 GGAGGAGCTACTTCTGGGAGAGCTGACAGTGACAGGAACCTCCCCAGACTCCCTGAGCCTCTCCTGGACCGTCCCCAG
 R S Y F W E S * Q * Q E P P P D S L S L S L S W T V P Q
 GGACACTTTGACTCCTTCACTGTCCAGTACAAGGACAGCAGTGGGCGGCCCCAGGTGATGCGCATCGGGGGCCAGGAGAG
 G H F D S F T V Q Y K D S S G R P Q V M R I G G Q E R
 GGAGGCCATTGTGACAGACCTGGATCCTGGTGCAGTACAAGATGAACCTGTATGGATTCCATGAGGGGCGTCGTGTGG
 E A I V T D L D P G R K Y K M N L Y G F H E G R R V G
 GCCCCGTGTCCACCGTGGGCACAGTTCCGAGGACAGTTGACCAGTTCTGTGTACAGTACAAGAACGGGGATGGGCAGCCC
 P V S T V G T V P R T V D Q F V Y Q Y K N G D G Q P
 AAGGTGGTGCAGGTGCCAGGGTACGAGGACCAGGTCACCATCTCCGGCCTGGAGCCAGACCACAAGTACAAGATGAACCT
 K V V Q V P G Y E D Q V T I S G L E P D H K Y K M N L
 GTATGGCATCCACAGCGGCCAGCGTGTGGGCCCCATGTCTGTACAGGCGTGACGGCTGCAGAGGAAGAGCCCCCTCAGCC
 Y G I H S G Q R V G P M S V T G V T A A E E E P L S P
 CCACAGAGCCCAGCACAGAGGGCCCCAGAGCCCACCGAGGAGGAGGAGCCGCTCCTGGGAGAGCTGACAGTGACAGGATCC
 T E P S T E A P E P T E E E E P L L G E L T V T G S
 TCCCCAGACTCCCTGAGCCTCTCCTGGACCGTCCCCCAGGGACACTTTGACTCCTTCACTGTCCAGTACAAGGACAGCAA
 S P D S S L S L S W T V P Q G H F D S F T V Q Y K D S N
 TGGGCGGCCCCAGGTGGTGCATGTGCGGGGCCAGGACAGGGCCATCGTGAGAGACCTGGATCCTGGTGCAGCAAGTACA
 G R P Q V V H V G G Q D R E A I V R D L D P G R K Y K
 AGATGAACCTGTATGGATTCCATGAGGGGGCGTCGTGTGGGCCCCGTGTCCACCGTGGGGTGACCGCTCCAGAGGAGGAA
 M N L Y G F H E G A S C G P R V H R G V T A P E E E
 GCTCCGACCACACAGGCAGTGCCACCACGACTCCTGAGCCCCCTCCTAAGAAACCCCTCCTGGGAGAGCTGACCGTGAC
 A P T T Q A V P T T T P E P P P K K P L L G E L T V T
 AGATGCCACCCCTGACTCCCTGAGCCTCTCCTGGACAGTCCCTGAGGGACAGTTTGACCAGTTCTGTATCCAGTACAAGA
 D A T P D S L S L S W T V P E G Q F D Q F V I Q Y K N
 ACGGGGATGGGCAGCCCAAGGTGGTGCAGGGTACGAAGACCAGGTACCATCTCCGGCCTGGAGCCAGACCAC
 G D G Q P K V V R V P G Y E D Q V T I S G L E P D H
 AAGTACAAGATGAACCTGTATGGCATCCACAGCGGCCAGCGTGTGGGCCCCGTGTCTGTCTATAGGCGTGACAGCTGCAGA
 K Y K M N L Y G I H S G Q R V G P V S V I G V T A A E
 GGAAGAGCCCCCAGCCCCACAGAGCCAGCACAGAGGCCCATATCCACAGAGGAGGATCCGCTCCTGGGAGAGCTGA
 E E P P S P T E P S T E A P Y P T E E D P L L G E L T
 CAGTGACAGGATCCTCTCCAGACTCCCTGAGCCTCTCCTGGACTGTCCCCCAGGGAGACTTTGACTCCTTCACTGTCCAG
 V T G S S P D S L S L S W T V P Q G D F D S F T V Q
 TACAAGGACAGCAGTGGGCGGCCCCAGGTGGTGCAGTGTGGGAGCCAGGACAGGGAGGCCATTGTGACAGACCTGGATCC
 Y K D S S G R P Q V V R V G S Q D R E A I V T D L D P
 TGGACGCAAGTACAAGATGAACCTGTATGGATTCCATGAGGGGGCGTCGTGTGGGCCCCGTGTCCACTGTGGGCGTGACTG
 G R K Y K M N L Y G F H E G R R V G P V S T V G V T A
 CCTCTCTGACCACAGAGCCCCCATCCAGCCCCGCTGGGAGAGCTGGCTGCGGGTACAAGTGACTCCCAGGCTGTGCAC
 S L T T E P P I Q P R L G E L A A G T S D S Q A V H
 CTGTCTGACTGTGCCAGGGCCCCCTTCGACTCCTTCTGGTCCAGTACAGGGACGCACAGGGACAGCCCCAGATGGTG
 L S W T V P Q G P F D S F L V Q Y R D A Q G Q P Q M V
 CCTGTGAGCGGAGACCTGAGTGAGGTACCGTCTCAGGTCTGGAGCCATCCCGCAAGTACAAGTTTCTCCTCTTTGGACT
 P V S G D L S E V T V S G L E P S R K Y K F L L F G L
 CCTGGGTGGGAAGCGCCATGGCCCTGTCTCCACAGAAGCAAAGACTGCCGCCCTGGAGAAGACACCGCAGCCCCGTCTCG
 L G G K R H G P V S T E A K T A A L E K T P Q P R L G

STGAACTGTCAGTGGCAGGGGGAGACCTCTGACTCCGTGCACCTCTCATGGACTGTGGTCCAGGGTCCCTTTGACTCCTT
 E L S V A G G D L * L R A P L M D C G P G S L * L L
 CCTGGTCCAGTACAAAGACAAGGATGGGCAGCTCCAGACAGTTCCGTGTGCTGCAGACCAGCAGGAGGTACCATAGAGGG
 P G P V Q R Q G W A A P D S S C A A D Q Q E V T I E G
 TCTGCAGCCAGGCAGGAAATACAAATTCTTGCTCTTTGGGCTCACTGGAGAAAAAGCGCCTGGGACCCATCTCTGCCTTG
 L Q P G R K Y K F L L F G L T G E K A P G T H L C L G
 GGAGTGACAGCCTCAGAAGTGGACACATCAACCCCAAACCCCACTGAGCACCTGAGACACCCACCTGGGGACGCTGG
 S D S L R S G H I N P K P P L S T L R H P T W G R W
 CAGTGAAGTGAAGCAACCCCAAACCTCCCTGCGCCTCTCCTGGGGTGTGCCCGCGGCCCTTTGACTCCTTTGTGGTCCAGT
 Q * L R Q P Q T P C A S P G V C P R P L * L L C G P V
 ACCAGGACACAGAGGGGCAACCCAGGCCCTGCTTGTGATGGGAACCAGACAAAGTCTCATCTCAGACCTGAAACCCA
 P G H R G A T P G P A C * W E P D K V L I S D L K P S
 GCACTTCCTACAAATTCTTCCTCTATGGCCTCAGTCAAGGGACACGCCACGGACCTGTCTCTGCAGAGGGCACCACAGAT
 T S Y K F F L Y G L S Q G T R H G P V S A E G T T D
 CCAGTTCCCTGCTGGTCAGGGCCCAGGGGACCCCGGGCCCGCCTGTCTCAGCTCTCAGTGTGACAGCTGACCACAGTTC
 P V P A G Q G P G D P G P R L S Q L S V S D V T T S S
 GCTGCGCTAAAGTGGGAAGCCCGCTTGGGTCTTTGACTCTTTCTACTACGCTTTGGGGTTCCTTTACCAAGTACCC
 L R L N W E A P L G S F D S F L L R F G V P L P S T L
 TGGAGCCGCATCCTCGCCCTCTGCTCCAGCGAGAGCTTATGGTGCCAGGGACGCGGCGCTCGGCCGTGCTTCGAGACCTG
 E P H P R P L L Q R E L M V P G T R R S A V L R D L
 CGTCCCGGAACCTGTACAGCCTTACTCTGTATGGGCTGCGTGGGCGCACAAGGCAGACAGCATCCAGACCACTGCCCG
 R P G T L Y S L T L Y G L R G P H K A D S I Q T T A R
 CACGCTCAGCCAGTTCTGGAGAGCCCTCGGGACCTGCAATTCAGTGACATCGGGGAAACGTCAGCCAAAGTCACCTGGG
 T L S P V L E S P R D L Q F S D I G E T S A K V T W V
 TGCCGCCATCATCCAGGGTGGACAGCTTCAAATCTCCTACCAGCTAGCAGATGGAGGAGAGCCACAAAGTGTGCAGGTG
 P P S S R V D S F K I S Y Q L A D G G E P Q S V Q V
 GTAGGCCGGACCCACACCCAGATCCTCCAGGGGCTCATTCCGGACACTCGCTATGAGGTGACTGTGGTCTCAGTCCGTGG
 V G R T H T Q I L Q G L I P D T R Y E V T V V S V R G
 CTTTGAGGAGAGTGAGCCTCTCACAGGTTTCTCACCACAGTTCCTGATGGTCCCACCCAGCTACGGGCATTAACTTGA
 F E E S E P L T G F L T T V P D G P T Q L R A L N L T
 CTGACAGATCTGCCCTTCTGCACTGGAAACCTCCCCACAAGCCGGTGGACAAATACAACGTCCAGGTGCGATCCCCTGGG
 D R S A L L H W K P P H K P V D K Y N V Q V A S P G
 GCCCACCCTTCAGGCCTCGGCACCTGGCAGCGCTGTGGACTACCCGCTGACGACCTGTGATGACACCAATTACACAGC
 A P P L Q A S A P G S A V D Y P L T T C H D T N Y T A
 CACCGTGCCTGGTCTCCGGGGTCTAACTTCACCTCCCCAGCCAGCATTAACCTTCACCACAGGGTTAAAGCCCCCCCCAGG
 T V R G L R G P N F T S P A S I N F T T G L K P P Q D
 ACTTGAGGCCAAGGAAGTGAAGTCTCGAACGCCCTGCTCACTGGACCGCGCTAAGTTCACCCACAGCTACCTGCTCA
 L E A K E V T P R T P L L T G P R * V P P T A T C S
 GCTTTGACACCCCGGAGACAGATTGAGGAAATCCTCTTCCAGCAGGACCACCTCACACAGGCTTCTCGCCCTCTTCCC
 A L T P P E T D S G N P L P A G P P H T G F S A L F P
 TCCACCTTCTACAGCGCCAGCTCGGCTATTTGGCGAGAGCTCACACCTCCTTGTCTCTTTACTACTGTGGCTCGGATCC
 P P S T A P A R L F G E S S H L L V I F T T V A R I P
 CTCCCAGCGACTTGGGAGGAGCTGAAAATGGGGCCAGCGCCTCAAAGACCACCACATCTTCTCAATGGCAACCGCG

AGCGCCCCCTTGGATGTGTTTTGTGACATGCAGACTGACGGAGGGAGGTTTGGCTGGTGTTCAGCGCCGATGGACGGACA
 GACAGACTTCTGGAGAGACTGGGAGGAGTACGCCCATGGTTTCGGGAACATCTCCAGGGAATTCTGGCTGGGCAATGAGG
 CCCTTCACAGCCTCACGCAGGCTGGAGACTACTCTATGCGTGTGGACCTGCGGGCCGGAAGGAAGCCGTGTTGCCCCAG
 TATGACTTCTTCCGAGTAGACTCAGCGAACAGGAGAACTATCGTCTACAACCTAGGGGGCTACCATGGGACCGCGGGGT
 CTCTATACCGCGGGGTCTCTATGAGCTACCACAGCGGCAGTGTCTTTTCGGCCCGTATCGAGACCCCAATAACTTGCTCA
 TCTCCTGCGCTGTCTCCTACCGTGGCGCTTGGTGGTACAAGAACTGTCACTACGCAACCTCAACGGGCTCTATGGAAGCA
 CAGTGGATCACCAGGGAGTAGCTGGTACCACTGGAAGGGCTTCGAGCTTCTCGGTGCCTTCACGGAAATCAAGCTGAGAC
 CCAGAACTTCAGGCCCCCACCAGGGCACCTGAGCCTGCTGCCACCTCACTCACACCCTGGTATGACTGCGAGCACTGAG

3GGTTGCGCTGCCCAGAGAAGAGCCAGGTGTGTCTACTGTGCTAGCTCACCGAGGGAAGCCTTCTTGCCACAGTCTCACAGCACCATGTTTACAGG
 GGGGAGGGGAGGGGAATGGAGCAATAAGGAGGAGAACTGAGGCACTAGGCTCATCTTAAAAA(N) 5095

Figura 13 – Alinhamento múltiplo das proteínas TN-X. Alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos do cDNA 8B (Rato) com as sequências (dbj/BAA24436.1), pir/T09070, gb/AAB67981.1 e a sequência (GI 2462979 – embl Y11915.1), obtido pelo programa CLUSTAL X.).

CLUSTAL X (1.81) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\Temp\8B1PROT100port.ps

Date: Wed Sep 27 23:06:50 2000

Page 1 of 6

	Camundongo	MAAQCIP-SILITILLVLLGLARACFPSPRSNVTLPAPEPPPKPGG	PSSQLYETVEGGKQVVITRINLPPSAGCCPFPSEPTVPFAEIVC	90
	z/T09070Mouse	MAAQCTP-SILTILLVLLGLARACFPSPRSNVTLPAPEPPPKPGG	PSSQLYETVEGGKQVVITRINLPPSAGCCPFPSEPTVPFAEIVC	90
	Bovino	MPDCLLSNLALIMLLGVTAAPFSPFSN-ELPAPEPPQP	PSRLYATVEGGKQVVITRINLPPSAGCCPFPSEPTVPFAEIVC	100
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100		
<hr/>				
	Camundongo	ALAEVLLEIIELVKLERCTGGCCPFAAAGAGTGTIVVSILCSLEGVTULSRACACNCPGNWGPFCSTUPDTKEPSSPPSK	SCTPCOCHQACVNG	188
	pir/T09070Mouse	ALAEVLLEIIELVKLERCTGGCCPFAAAGAGTGTIVVSILCSLEGVTULSRACACNCPGNWGPFCSTUPDTKEPSSPPSK	SCTPCOCHQACVNG	188
	Bovino	ALAEVLLEIIELVKLERCTGGCCPFAAAGAGTGTIVVSILCSLEGVTULSRACACNCPGNWGPFCSTUPDTKEPSSPPSK	SCTPCOCHQACVNG	200
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	110.....120.....130.....140.....150.....160.....170.....180.....190.....200		
<hr/>				
	Camundongo	CVCPTGYSDPSCSWPSCPDCQCGRCVKGVCVCRAGSGPDSCQSFCFNCHNRGRCELRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		288
	pir/T09070Mouse	CVCPTGYSDPSCSWPSCPDCQCGRCVKGVCVCRAGSGPDSCQSFCFNCHNRGRCELRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		288
	Bovino	CVCPTGYSDPSCSWPSCPDCQCHGRGVGVGVESGDSGDGVSCFPCSQRACCDGRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		300
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300		
<hr/>				
	Camundongo	SGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS	SGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS	388
	pir/T09070Mouse	SGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS	SGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS	388
	Bovino	SGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS	SGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS	400
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400		
<hr/>				
	Camundongo	EPCFECNRRGRNDRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		488
	pir/T09070Mouse	EPCFECNRRGRNDRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		488
	Bovino	EPCFSDCNRRGRNDRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		500
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480.....490.....500		
<hr/>				
	Camundongo	KKCKRVKGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		588
	pir/T09070Mouse	KKCKRVKGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		588
	Bovino	KKCKRVKGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		592
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600		
<hr/>				
	Camundongo	NELCHASAGTAGECSIICPANCERGRCELRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		688
	pir/T09070Mouse	NELCHASAGTAGECSIICPANCERGRCELRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		688
	Bovino	NELCHASAGTAGECSIICPANCERGRCELRGVCFSTSGEDCGVESCPGCCSURCACNCLCYMPS		692
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700		
<hr/>				
	Camundongo	NGVVGRTNSPICAIGTCPDCKSRKACIQRCVCGTATNCMLIPAINGRULLLETIVSNTRAPEPVDAIRIFTIPMCVYPFLAKVP		788
	pir/T09070Mouse	NGVVGRTNSPICAIGTCPDCKSRKACIQRCVCGTATNCMLIPAINGRULLLETIVSNTRAPEPVDAIRIFTIPMCVYPFLAKVP		788
	Bovino	NGVVGRTNSPICAIGTCPDCKSRKACIQRCVCGTATNCMLIPAINGRULLLETIVSNTRAPEPVDAIRIFTIPMCVYPFLAKVP		792
	gb/AAB67981.1			
	Rato			
	ruler	710.....720.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800		

File: C:\Temp\8B1PROT100port.ps
Page 2 of 6

Page 2 of 6

Camundongo	VEVVVVTAKRGHVAVSPASIRANNGSLPSEILLATATPPPPSPSTTGAGAPILILHPLCLLVLGKAGSLVAVAGAPSTFAVILGAVAGSP	988
pix/T09070Mouse	VEVVVVTAKRGAVSPASIRANNGSLPSEILLATATPPPPSPSTTGAGAPILILHPLCLLVLGKAGSLVAVAGAPSTFAVILGAVAGSP	987
Bovino	VEVVVVTAKRGRAVSPASIRANNGSLGGLLCASTPPPPSPSTTGAGAPVVLQRPQLALSLVLGKAGSLVAVAGAPSTFAVILGAVAGSP	998
gb/AAB67981.1	-----	
Ratio	-----	
ruler	910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000	

[illegible]

Camundongo	PGALSVDPGPGSTPISCLP	PGKSTVILSLVKKKPG	PGINAKILLISGPP	PGPPPLGLVVTVP	PGKSLASVLAGG	PGVVKKKSGPV	1188
pir/T09070Mouse	PGALSVDPGPGSTPISCLP	PGKSTVILSLIKKKPG	PGINAKILLISGPP	PGPPPLGLVVTVP	PGKSLASVLAGG	PGVVKKKSGPV	1187
Bovino	PGVVVPGPGPGALINLSDVGGK	PGVILSLVGGGGPG	PGVNAKILLISGPP	PGSPVPPPLGLVVTVP	PGDGLASVVP	PGKSNVSGRAGRP	1197
gb/AAB67981.1	-----						
Rato	-----						
ruler	1110.....	1120.....	1130.....	1140.....	1150.....	1160.....1170.....1180.....1190.....1200	

[illegible][illegible][illegible]

Camundongo	155
pir/T09070mouse	155
Bovino	159
gb/AA67981.1	0
Rato	2
ruler	

File: C:\Temp\8BIPROT100port.ps
Page 3 of 6

Page 3 of 6

Carundongo	ASLLLPPLGLLTVSVTPDVLVLLVVPKSTDPFVYKXNDGPVVYAAILVQVPIPLPSEKXTLLGVDKSKGVV-A	1750
gr/T09070Moose	ASLLLPPLGLLTVSVTPDVLVLLVVPKSTDPFVYKXNDGPVVYAAILVQVPIPLPSEKXTLLGVDKSKGVV-A	1710
Bovino	VSPPEPLGLLEVTVAIPDVGLSVAEAGTSLVVKNDGPPVYPVADQVVEIPLPSEKXTLLGVDKSKGVV-A	1796
gb/AAB67981.1	-----	83
Rato	1710.....1720.....1730.....1740.....1750.....1760.....1770.....1780.....1790.....1800	23
ruler	-----	

Camundongo	PGAPPLKGLAVDPFDLSLGLVVEGDSIVVVKRSGPVVVFVGGGKASTALDAGKPTFLVLLGLKSTPFLAIIIPFAAS	1840
iz/T09070Mouse	PGAPPLKGLAVDPFDLSLGLVVEGDSIVVVKRSGPVVVFVGGGKASTALDAGKPTFLVLLGLKSTPFLAIIIPFAAS	1800
Bovino	PGAPPLKGLAVDPFDLSLGLVVEGDSIVVVKRSGPVVVFVGGGKASTALDAGKPTFLVLLGLKSTPFLAIIIPFAAS	1896
gb/AAB67981.1	PGAPPLKGLAVDPFDLSLGLVVEGDSIVVVKRSGPVVVFVGGGKASTALDAGKPTFLVLLGLKSTPFLAIIIPFAAS	83
Rato	-----	23
ruler	1810.....1820.....1830.....1840.....1850.....1860.....1870.....1880.....1890.....1900	

Camundongo	-----KSKLLKKLVGVIVTNSVILLSSVVSDGQDPSVVVKDKGASGVVPVVGSEKEVVSCLIPCKYKILLSCILNKKVEVLPLVINVPPKSTKA	1944
ir/T09070Mouse	-----KSKLLKKLVGVITANSVILLSWTVSGLDPSVVVKAKRGSGGVVPVVGSRKEVRSCLIPCKYKILLSCILNKKVEVLPLVINVPKSTKA	1904
Bovino	-----KSPSPKLGGELVVTISNVILLSWVPTCHTDHGVIVSGRGGSPGVVPFESRR---EVSLLPAPKTCILLSLSRDKEVPIALAVVPAPREI	1993
gb/AAB67981.1	-----DAVF-----	87
Rato	-----	23
ruler	1910.....1920.....1930.....1940.....1950.....1960.....1970.....1980.....1990.....2000	

Camundongo	2044
lr/T09070Mouse	2000
Bovino	2092
gb/AAB67981.1	87
Ratio	23
ruler	
2010	2020
2030	2040
2050	2060
2070	2080
2090	2100

Accession	Protein	Position	Residue	Mass	Charge	Score	Rank				
Camundongo	PR010000	1000	1000	1000	1000	1000	2138				
ir/T09070	PR010000	1000	1000	1000	1000	1000	2047				
Bovine	PR010000	1000	1000	1000	1000	1000	2191				
gb/AAB67981.1	PR010000	1000	1000	1000	1000	1000	167				
Ratio							70				
ruler		2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200

Camundongo	2236
ir/T09070Mouse	2052
Bovino	2196
gb/AAB67981.1	172
Ratio	75
ruler	2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300

Camundongo	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
u/T09070Mouse	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP
Bovino	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP
gb/AAB67981.1	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP
Rato	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP	SPVSVGVVVPKPKPKHASSLP
ruler	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400

Date: Wed Sep 27 23:06:50 2000

[illegible]

CLUSTAL X (1.81) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\Temp8B1PROT100port.ps
Page 5 of 6

Date: Wed Sep 27 23:06:50 2000

CLUSTAL X (1.81) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\Temp8B1PROT100port.ps
Page 6 of 6

Date: Wed Sep 27 23:06:50 2000

```

***
Camundongo  LPAGTTPRRLLRLFPPTTSAQLRAIINGDILPPVLEIPPTGGLIPPTCCGLKIPBASDCLIPPLSSKIPPLVFCIASTGGGGLVPTTAC 3946
pir/T09070Mouse  LPAGTTPRRLLRLFPPTTSAQLRAIINGDILPPVLEIPPTGGLIPPTCCGLKIPBASDCLIPPLSSKIPPLVFCIASTGGGGLVPTTAC 3748
Bovino  LPAGTTPRRLLRLFPPTTSAQLRAIINGDILPPVLEIPPTGGLIPPTCCGLKIPBASDCLIPPLSSKIPPLVFCIASTGGGGLVPTTAC 3959
gb/AAB67981.1  LPAGTTPRRLLRLFPPTTSAQLRAIINGDILPPVLEIPPTGGLIPPTCCGLKIPBASDCLIPPLSSKIPPLVFCIASTGGGGLVPTTAC 1530
Rato  LPAGTTPRRLLRLFPPTTSAQLRAIINGDILPPVLEIPPTGGLIPPTCCGLKIPBASDCLIPPLSSKIPPLVFCIASTGGGGLVPTTAC 1240
ruler  .....4010.....4020.....4030.....4040.....4050.....4060.....4070.....4080.....4090.....4100

```

```

*****
Camundongo  QSDTWKDWEDYARGTGNISGFNWLGNALSLIAGSTTLEVLKAGKAVTACDITFVDSAKN--YELILGCTGTAGTAC 4040
pir/T09070Mouse  QSDTWKDWEDYARGTGNISGFNWLGNALSLIAGSTTLEVLKAGKAVTACDITFVDSAKN--YELILGCTGTAGTAC 3842
Bovino  QSDTWKDWEDYARGTGNISGFNWLGNALSLIAGSTTLEVLKAGKAVTACDITFVDSAKN--YELILGCTGTAGTAC 4053
gb/AAB67981.1  QSDTWKDWEDYARGTGNISGFNWLGNALSLIAGSTTLEVLKAGKAVTACDITFVDSAKN--YELILGCTGTAGTAC 1623
Rato  QSDTWKDWEDYARGTGNISGFNWLGNALSLIAGSTTLEVLKAGKAVTACDITFVDSAKN--YELILGCTGTAGTAC 1340
ruler  .....4110.....4120.....4130.....4140.....4150.....4160.....4170.....4180.....4190.....4200

```

```

****
Camundongo  KQPNSLLICAVSTEGAWWYENCYANILNLYGCTVDSGVWYTWGIDITFVPTKGLIPKSTFVPTKGLIP 4112
pir/T09070Mouse  KQPNSLLICAVSTEGAWWYENCYANILNLYGCTVDSGVWYTWGIDITFVPTKGLIPKSTFVPTKGLIP 3914
Bovino  KQPNSLLICAVSTEGAWWYENCYANILNLYGCTVDSGVWYTWGIDITFVPTKGLIPKSTFVPTKGLIP 4125
gb/AAB67981.1  KQPNSLLICAVSTEGAWWYENCYANILNLYGCTVDSGVWYTWGIDITFVPTKGLIPKSTFVPTKGLIP 1694
Rato  KQPNSLLICAVSTEGAWWYENCYANILNLYGCTVDSGVWYTWGIDITFVPTKGLIPKSTFVPTKGLIP 1425
ruler  .....4210.....4220.....4230.....4240.....4250.....4260.....4270.....4280.....

```

3.3. Construção da biblioteca ST1HY24 de cDNAs subtraídos sintetizados a partir de RNA extraído de células ST1 tratadas com hidrocortisona por 24 h.

3.3.1. Síntese dos cDNAs "driver" e "tester".

A biblioteca ST1HY24 foi construída com o propósito de direcionar o enriquecimento, para sequências, exclusivamente, reguladas por hidrocortisona. Para tal, células ST1 foram tratadas exclusivamente com hidrocortisona (100 ng/ml) por 24 h, a fim de acumular o maior número possível de células que sofreram o efeito do hormônio. mRNAs extraídos destas culturas foram convertidos em cDNA e utilizados como "tester". Para a síntese de cDNA "driver" foram utilizadas culturas de células ST1 não tratadas. Os protocolos utilizados para síntese dos cDNAs foram os mesmos descritos para a construção da biblioteca ST1HYC5.

3.3.2. Geração dos amplicons e ligação aos adaptadores.

Aproximadamente 2 µg de cDNAs "tester" e "driver" foram clivados com *Rsa* I e purificados. Alíquotas da amostra "tester" (~100ng) foram ligadas aos adaptadores 1 e 2 essencialmente como descrito no item 1.2 para desempenhar PCR supressivo após a etapa da hibridização. A eficiência de ligação dos cDNAs aos adaptadores foi medida pela amplificação de GAPDH, utilizando-se "primers" gene-específicos (item 2, sub-itens 2.1.3.8 e 2.1.3.9) e "primers" que amplificam a partir das extremidades de cada adaptador ("primers" 1 e 2; 2.1.3.4. e 3.1.3.5). Após inativação das reações de ligação, alíquotas de 1µl de cada uma delas foi diluída em 200µl de água e utilizada para PCR conforme mostrado no *quadro 1*. A análise da eficiência da ligação é mostrada na *figura 14*. Ligações com eficiência maior que 50% foram utilizadas para a etapa de subtração.

Figura 14 – Análise da eficiência de ligação dos adaptadores 1 e 2 ao cDNA tester (ST1HY24). Aliquotas de $1\mu\text{l}$ de cada ligação, previamente diluídas 1:200, foram amplificadas por PCR conforme esquema demonstrado no quadro 1. $5\mu\text{l}$ foram analisados em gel de agarose/TAE 1 X. 1) 2) 3) 4) e 5), conforme quadro 1 no item 3.1.3. (pág. 32). O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech).

3.3.3. Subtração de sequências positivamente reguladas por Hy em células ST1 tratadas por 24h.

A etapa de subtração foi conduzida essencialmente conforme descrito no item 1.4, exceto o tempo de duração da primeira hibridização que foi aumentado de 1h. Após a primeira e a segunda hibridização, quatro alíquotas diferentes da amostra subtraída foram, então, utilizadas para amplificação, por PCR supressivo, com os "primers" 1 e 2 (PCR primário; 2.1.3.4 e 2.1.3.5). Para enriquecer os hetero-híbridos formados, alíquotas diluídas das reações de amplificação anterior foram re-amplificadas usando "nested primers" 1 e 2 (PCR secundário; 2.1.3.6 e 2.1.3.7).

O perfil de amplificação dessa biblioteca de cDNAs subtraídos foi também analisado através de incorporação de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ 3.000Ci/mmol durante o PCR secundário com os "primers" "nested" e os produtos foram então fracionados em gel de poliacrilamida 5% desnaturante. O resultado está mostrado na *figura 15*. Foi possível visualizar, aproximadamente, 25 bandas presentes em maior abundância na amostra subtraída ou que mantiveram sua abundância inalterada. Além disso, aproximadamente 5 destas bandas são também visualizadas na biblioteca ST1HYC5.

A análise da eficiência de subtração foi analisada pela comparação entre a abundância relativa do cDNA que codifica para GAPDH antes e após o procedimento de subtração, como descrito no item 1.5. Como pôde ser verificado na *figura 16*, a eficiência de subtração obtida nesse experimento foi um pouco inferior aquela obtida na construção da biblioteca ST1HYC5.

PCR primário
PCR secundário

Nº de ciclos

Não subtraída			Subtraída		
30	30	30	30	30	30
11	14	17	11	14	17

69

Figura 15 – Análise do perfil de amplificação das amostras subtraída ST1HY24 e não subtraída em gel de poliácridamida desnaturante. Aliquotas do PCR primário foram amplificadas com os "primers nested" 1 e 2 na presença de dCTP 3.000Ci/mmol, durante 11, 14 e 17 ciclos de PCR. 5 µl de cada reação foram fracionados em gel de poliácridamida desnaturante e após secagem, o resultado foi revelado por autoradiografia.

Figura 16 – Análise da eficiência de subtração nas amostras subtraída ST1HY24 e não subtraída. Aliquotas do PCR secundário diluído foram utilizadas para analisar a abundância relativa de GAPDH na amostra subtraída (1-4) e não subtraída (5-8) por PCR usando-se primers específicos durante 18 ciclos (1 e 5), 23 ciclos (2 e 6), 28 ciclos (3 e 7) e 33 ciclos (4 e 8). Após fracionamento em gel de agarose 2% TAE, o gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA ladder (Amersham Pharmacia Biotech).

3.3.3.1. Confirmação de clones diferencialmente expressos obtidos a partir da biblioteca ST1HY24.

Alíquotas do PCR secundário da amostra subtraída foram preenchidas, usando Klenow e dNTPs, fosforiladas e ligadas ao vetor pUC18 no sítio de *Sma* I. Os produtos da ligação foram utilizados para transformar *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' originando uma biblioteca de aproximadamente 5.000 clones. Inicialmente, de 500 clones, selecionados ao acaso, 200 foram utilizados para sequenciamento de DNA dos insertos clonados. 15 clones foram encontrados mais de uma vez, enquanto o restante são únicos. A **tabela 3** mostra um resumo dos clones selecionados para a análise. Um total de 24 clones tiveram sua expressão analisada em Northern blot, usando-se amostras de células ST1 tratadas com Hy por 5h e não tratadas. Seis clones mostram ter sua expressão aumentada por Hy, produzindo uma prevalência de clones diferencialmente expressos de 1: 3,4. (**Figura 17**).

Dos clones regulados positivamente, todos correspondem a seqüências de genes já descritos (**Tabela 4**), porém que não haviam sido descritos previamente como sendo regulados por glicocorticóides. cDNAs encontrados 5 vezes tem um grau de 100 % de confirmação. cDNAs encontrados 2 vezes tem um grau de confirmação de 1:6. Foram considerados genes de baixa abundância, aqueles para os quais a detecção não foi possível através de Northern blot contendo de 20µg de RNA total. Isto indica um nível de normalização de aproximadamente 1:4 entre genes raros e abundantes.

Tabela 3 - Clones selecionados para análise de expressão diferencial na biblioteca ST1HY24

Clones	Redundância na biblioteca	Similaridade em bancos de dados (Genbank / dbEST)	Expressão diferencial
ST1HY24-2	2	enzima conjugada a ubiquitina ubc2e gb/U13176.1	Não alterada
ST1HY24-4	1	mRNA UV118 (ativado por UVB) gb/U12527.1	*
ST1HY24-5	4	mRNA de env de retrovirus tipo C gb/U63133.1	Induzida (Valentini & Armelin, 1996)
ST1HY24-8	1	p162 (iniciador de tradução) (gb/u14172.1/ MMU14172	*
ST1HY24-9	5	Trombospondina 1 gb/M62470.1/ MUSTHREX22	Induzida
ST1HY24-10	1	mRNA para fator de elongação emb/X61043.1	*
ST1HY24-16	1	gb/H19122 EST FLJ20156	*
ST1HY24-17	1	KIAA 0729 dbj/AB0118272.1	*
ST1HY24-15	1	EST351093 gb/AW919789.1	*
ST1HY24-19	2	p18 inibidor de CDK6 gb/AF058759.1	*
ST1HY24-20	1	ciclina G ref/NM 012923.1	Induzida
ST1HY24-21	1	EST 601666047F1 CGAP	*
ST1HY24-28	1	WDNM2 emb/X17464.1	Não alterada
ST1HY24-30	1	EST 0042 gb/AI001460.1	*
ST1HY24-32	2	quinase ligada a integrina (Ilk) ref/nm 010562.1	Não alterada
ST1HY24-35	1	Makorin (ring finger) ref/NM 018810.1	*
ST1HY24-37	1	pepstatina lisossômica gb/BE952773.1	*
ST1HY24-38	1	EST 6061666047F1 CGAP	*
ST1HY24-39	1	Folistatina gb/M3159.1	Induzida
ST1HY24-40	1	AML1 (leucemia mielóide aguda) ref/NM 017325	*
ST1HY24-43	1	EST 514 (CANCER COLO RETAL) gb/T24939.1	*

ST1HY24- 49	1	EST AF107109 gb/AF107109.1	*
ST1HY24-53	2	KIAA0619 dbj/AB014519.1	Não alterada
ST1HY24-54	2	NADP isocitrato desidrogenase gb/L35317.1	*
ST1HY24-55	2	Mov-34 gb/M64641.1	*
ST1HY24-56	1	alfa tubulina gb/MI13446.1	*
ST1HY24-57	1	EST 227853 gb/AI231165.1	*
ST1HY24-58	1	Proteína ferro-enxofre Rieskie gb/M2454.2	*
ST1HY24-59	2	EST gb/BE116582.1	Não alterada
ST1HY24-60	5	CL100 gb/U02553.1	Induzida
ST1HY24-61	1	EST gb/BE985005.1	*
ST1HY24-66	1	Glicoproteína sulfatada 2 emb/AJ279834.1	*
ST1HY24-63	1	EST222135 gb/AI178461.1	*
ST1HY24-75	1	(-)	*
ST1HY24-83	1	MLN51 ref/NM 07359.1	Não alterada
ST1HY24-85	1	NRP/B ref/NM 03622.1	Induzida
ST1HY24-86	1	EST UY37G10.Y1 CGAP gb/BF 016525.1	*
ST1HY24-87	1	EST214488 gb/AI105199.1	*
ST1HY24-78	1	TIMP-2 ref/NM011594.1	
ST1HY24-89	2	Proteína com domínio HMG-box ref/NM 13221.1	Não alterada
ST1HY24-92	4	gag/MMLV gb/AF136490.1	*
ST1HY24-93	1	EST349738 gb/AW918434.1	*
ST1HY24-96	2	Cisteino preteínase emb/XI6957.1	Não alterada
ST1HY24-101	1	Antígeno de rejeição tumoral ref/NM016926.1	*
ST1HY24-110	1	Proteína fosfatase V emb/X77236.1	*
ST1HY24-111	1	EST VM52C03.R1 gb/AA683989.1	*
ST1HY24-118	1	EST gb/BE105386	*
ST1HY24-119	1	EST 251964 gb/AI600261.1	*

ST1HY24-124	2	dineína citoplasmática ref/NM019226.1	*
ST1HY24-126	1	Semaforina E emb/X85994.1	*
ST1HY24-127	2	CGI-27 gb/AF132961.1	*
ST1HY24-128	2	KIAA 0650 dbj/AB014550.1	Não alterada
ST1HY24-131	1	gb/S83279.1	Não alterada
ST1HY24-136	1	PP2A ref/NM017039.1	Induzida
ST1HY24-137	1	(-)	*
ST1HY24-138	1	Metalotioneína 2 gb/M11794.1	Induzida (Valentini & Armelin, 1996)
ST1HY24-139	1	Antígeno de melanoma ref/NM008581.1	*
ST1HY24-141	1	EST gb/AW434254	*
ST1HY24-142	2	Sub-unidade β da proteína G emb/AJ132860.1	Não alterada
ST1HY24-145	1	Menadiona oxiredutase gb/J02608.1	*
ST1HY24-149	2	RAC proteína quinase α dbj/D30040.1	*
ST1HY24-150	1	EST 601225555F1 gb/BE375293.1	*
ST1HY24-157	1	EST 347565 gb/AW91626.1	*
ST1HY24-161	1	EST gb/AI021133	*
ST1HY24-168	1	EST290834 gb/AW140900.1	
ST1HY24-187	1	EST234493 gb/AI317822.1	*
ST1HY24-189	1	Tetraspanina TM4-A ref/NM 19793.1	*
ST1HY24-191	1	EST294695 gb/AW144399.1	*
ST1HY24-194	1	(-)	*
ST1HY24-195	1	emb/AJ251154.1	*

* indica clones cuja expressão diferencial não foi determinada.

Figura 17 – Confirmação dos clones diferencialmente expressos na biblioteca ST1HY24. Northern blot de RNA total extraído de cultura de células ST1 em crescimento exponencial tratadas com hidro cortisona (100 ng/ml) e/ou cicloheximida (10 µg/ml), ou não tratadas (controle). A) ST1HY24-9; B) ST1HY24-20; C) ST1HY24-60; D) ST1HY24-85; E) ST1HY24-39; ST1HY24-136. Os insertos de cada clone foram purificados, marcados radioativamente com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ 3.000 Ci/mol e utilizados com sonda durante as hibridizações.

3.3.3.2. Análise da cinética de expressão dos genes correspondentes aos cDNAs subtraídos após tratamento de células ST1 com soro e/ou Hy.

Para determinar de que forma soro e Hy afetam os níveis de expressão dos genes correspondentes aos cDNAs subtraídos, células ST1 foram mantidas em meio contendo 0,2% de soro por 24 h e, então, re-estimuladas com 5% de soro, 5% de soro + Hy ou Hy somente, por diversos períodos de tempo. Amostras de RNA foram então purificadas e fracionadas em gel de agarose, transferidas para membranas de nylon e hibridizadas com sondas radioativas correspondentes a cada um dos cDNAs marcados com α - ^{32}P -[dCTP] 3.000 Ci/mmol. Os níveis de expressão foram normalizados para os níveis de GAPDH. Os resultados são mostrado na *figura 18*. A quantificação, feita em Phosphor Imager, através do programa Imagequant e o gráfico de expressão relativa, encontra-se ao lado da figura. A expressão basal (0,2% de soro) foi considerada como 1. Os níveis de mRNA dos clone ST1HY24-9 e ST1HY24-20 foram rapidamente aumentados para 3,5X e 2X respectivamente em resposta à adição de 5% de soro. Entretanto, o tratamento, com Hy e soro, simultaneamente, elevou a expressão de ambos os mRNAs, alcançando o pico de expressão em 5 horas, com 31X o nível basal para ST1HY24-9 e 6X para ST1HY24-20. A adição de hidrocortisona apenas, elevou ainda mais os níveis de mRNA de ambos os clones, chegando a alcançar 74X e 9X para os clones ST1HY24-9 e ST1HY24-20, respectivamente. Por outro lado, os níveis de mRNA do clone ST1HY24-85 não foram afetados por soro e tornaram-se evidentes apenas em conjunto com hidrocortisona. O tratamento com hidrocortisona apenas, produziu resultados similares.

O transcrito correspondente ao clone ST1HY24-60 foi detectado após 1 hora de estimulação com soro, declinando a partir daí. O dobro de indução foi visto na presença de soro e hidrocortisona no mesmo tempo (~13X). É possível observar, também, uma expressão sustentada desta sequência declinando apenas após 5h. A estimulação com Hy apenas, torna este mais evidente, tornando

possível a detecção do transcrito até 12 h. O pico da expressão pode ser visualizado em 5h, com aumento de 25X em relação ao nível de expressão basal. Os níveis de expressão do clone ST1HYC5-28 não foram afetados por soro, mas foram dramaticamente aumentados por Hy e soro (40X em 5 horas). Com a adição de Hy unicamente, foram registrados os maiores níveis (87X) com um pico de expressão em 5h.

Figura 18 - Análise cinética da expressão dos genes correspondentes aos cDNAs subtraídos após tratamento de células ST1 com soro e/ou hidrocortisona. Análise cinética da expressão dos cDNAs subtraídos por soro fetal bovino (FCS) e/ou hidrocortisona (Hy) em células ST1 por Northern blot. Células ST1 foram mantidas em 0,2% de soro por 24 h e então reestimuladas por soro e/ou hidrocortisona (100ng/ml) por diferentes períodos de tempo. Aproximadamente 20µg de RNA total foram fracionados em gel de agarose-formaldeído, transferidos para membranas de náilon e hibridizados com os respectivos cDNAs marcados radiativamente. O nível basal (0,2% de soro) foi considerado como 1 para a construção do gráfico de expressão relativa mostrado ao lado.

3.3.3.3. Análise da expressão dos genes correspondentes aos cDNAs subtraídos, em células ST1 e P7 de glioma de rato e U87 de glioblastoma humano.

O padrão de expressão dos clones isolados foi analisado, por Northern blot, em células ST1 e P7 de glioma de rato e células U87 de glioblastoma humano em crescimento exponencial. Os resultados são apresentados na *figura 19*. Como no item anterior, a expressão relativa de cada sequência foi normalizada para os níveis de GAPDH. Os dados descritos nesse item se referem a amostras de RNA purificadas a partir de cultura de células mantidas em crescimento exponencial.

Sinais de hibridização, em mais de um dos tipos celulares analisados, foram detectados apenas para os transcritos dos clones ST1HY24-9, ST1HY24-20 e ST1HY24-60 em mais de um dos tipos celulares analisados. Os demais foram detectados apenas em células ST1 tratadas com hidrocortisona e/ou cicloheximida (*figura 19*). ST1HY24-9 pôde ser visualizado como um único transcrito de 5,5 kb tendo uma indução de 4X. Os níveis do mesmo transcrito em células ST1 e P7 não-estimuladas por Hy são dramaticamente diferentes (95% menor em células P7), porém possui o mesmo grau de indução na presença de hidrocortisona. Nenhum sinal de hibridização foi detectado em células U87. A diferença entre os níveis do mRNA de GAPDH para as células P7 e U87, por outro lado, é de apenas 3X. O clone ST1HY24-20 também hibridiza com um único transcrito de aproximadamente 3 kb, com um aumento de 2,5X após tratamento de células ST1 com Hy. O nível basal deste transcrito em células P7 não tratadas (controle) é 3,5X inferior ao encontrado em células ST1 na mesma condição. Entretanto, sob tratamento com Hy, nenhum aumento do mensageiro ocorre nas células P7. Não foi detectado sinal de hibridização quantificável em células U87 na presença ou ausência de Hy para o clone ST1HY24-20.

O clone ST1HY24-60 hibridiza com um único transcrito de aproximadamente 2,5 kb nas três células analisadas. O nível deste transcrito, na ausência de hidrocortisona, é 4X e 8X mais alto em P7 e U87, respectivamente, do que em células ST1. Após a adição de hidrocortisona, entretanto, uma redução de 2X e 5X é verificado em P7 e U87 respectivamente.

Figura 19 - Análise da expressão dos cDNAs subtraídos em células ST1, P7 e U87 na presença e ausência de hidrocortisona (100ng/ml) por Northern blot. Aproximadamente, 20µg de RNA total foram fracionados em gel de agarose-formaldeído, transferidos para membranas de náilon e hibridizados com os respectivos cDNAs marcados radioativamente. O nível basal de expressão nas células ST1 não tratadas foi considerado como 1 para o gráfico da expressão relativa mostrado ao lado. Para células ST1, o tratamento realizado foi hidrocortisona (100ng/ml) e/ou cicloheximida (10µg/ml).

Tabela 4 – Lista dos clones cuja expressão é induzida em células ST1 sob tratamento com hydrocortisona presentes nas bibliotecas de cDNAs subtraídos ST1HY24 e ST1HYC-5

Clones	Similaridade	Redundância na biblioteca	Nível de indução	Indução conhecida
ST1HYC5-28	Tenascina- X	1	87,3	Não
ST1HY24-9	Trombospondina-1	5	74,0	Não
ST1HY24-20	Ciclina G	1	9,3	Não
ST1HY24-39	Folistatina*	1	4,0	Não
ST1HY24-60	CL100/MKP1	5	25,0	Não
ST1HY24-85	NRP/B	1	13,0	Não
ST1HY24-136	PP2A *	1	2,50	Não

- Nível de indução quantificado em células crescendo exponencialmente.

4. DISCUSSÃO

A linhagem celular ST1 continua sendo um modelo para estudos de regulação gênica promovidos por glucocorticóides em função de sua hipersensibilidade ao tratamento com GCs e re-aquisição do controle de crescimento na presença destes agentes anti-tumorais. A identificação de genes regulados por GCs, associados ao controle do crescimento durante a reversão do fenótipo tumoral para normal promovido por GC, pode levar ao isolamento de genes com potencial atividade supressora de tumores do tipo glioblastoma e outros tumores responsivos a estes hormônios.

Particularmente, pouquíssimos genes são conhecidos como sendo regulados por GCs, particularmente no controle da proliferação celular. A linhagem celular ST1 já revelou 4 genes regulados por GCs isolados por hibridização diferencial (Valentini, & Armelin, 1996), tendo um deles, sido confirmado por "differential display" (Sasahara & Armelin, 1995).

Mais recentemente, nós identificamos neste trabalho, diversos genes regulados pelo glicocorticóide hidrocortisona em células de glioma de rato ST1, através da metodologia de subtração de cDNAs por PCR supressivo (Gursakaya et al, 1996). Esta metodologia, recentemente desenvolvida, facilitou definitivamente a subtração de cDNAs, tornando-a uma metodologia de fácil acesso e alto rendimento.

A possibilidade de selecionar as sequências de interesse em uma única etapa de PCR, supera a necessidade de diversas subtrações físicas empregando grandes quantidades de cDNA "driver" para o enriquecimento das mesmas. Além disso, a normalização da fração "tester" unicamente durante a subtração, leva a uma proporção equivalente entre transcritos abundantes e raros, permitindo uma representação destes últimos, em relação à proporção encontrada em bibliotecas não normalizadas. Isto amplia a capacidade de

analisar transcritos de baixa abundância, os quais por sua vez, correspondem a muitas das proteínas regulatórias nas células.

Em duas buscas não intensivas (de um número limitado de clones) foram encontrados 7 genes diferencialmente expressos, o que reflete a principal característica de uma biblioteca subtraída e normalizada: a alta redundância de clones alvo (sequências diferencialmente expressas).

Além disso, pelo menos 25% dos cDNAs corresponde a mRNAs raros, segundo o nosso critério (falha de detecção em Northern blots, utilizando-se 20µg de RNA total). Neste trabalho, as duas bibliotecas de cDNA subtraídas e normalizadas construídas (ST1HYC5 e ST1HY24), apresentam índices de normalização aproximados, com a proporção de transcritos raros e abundantes variando entre 25 e 27%, respectivamente. Os valores estão dentro daquele obtido em experimentos-padrão, que é de, aproximadamente 27% (Gurskaya et al, 1996).

A confirmação dos clones diferencialmente expressos foi feita através da escolha de clones ao acaso e quantificação dos níveis de expressão de cada gene, nas condições escolhidas, por Northern blot. Este tipo de análise em pequena escala, só seria útil se o grau de enriquecimento da biblioteca de cDNAs subtraídos fosse realmente alto. Por esta razão, foi escolhido como abordagem inicial. A utilização deste critério na análise da primeira biblioteca (ST1HYC5) mostrou que 2/5 das sequências apresentaram um alto grau (10X) expressão diferencial na condição subtraída (não tratada versus tratada com Hy e Chx por 5h), mas apenas 1/10 na condição desejada (Hy apenas). Isto revelou que apesar desta biblioteca apresentar diferenças significantes no perfil de amplificação entre as condições subtraída e não subtraída, continha duas fontes de falso positivos: o uso de Chx na presença de Hy, e a diferença na eficiência de subtração entre diferentes sequências. Em geral, as sequências não diferencialmente expressas tem sua redundância diminuída em graus variados na

biblioteca, principalmente em função das semelhanças entre as amostras "driver" e "tester".

As análises através de Northern reverso (não mostrado) foram frustrantes pois apresentavam baixo nível de sensibilidade para a detecção da maioria dos transcritos, sendo conseqüentemente abandonado. Entretanto, se utilizadas com alto nível de sensibilidade, como é o caso dos microarranjos de cDNAs, permitiriam uma ampla e rápida análise de bibliotecas subtraídas, em função do fato de serem bibliotecas de reduzida complexidade devido à retirada de seqüências comuns em driver e tester.

Os clones ST1HYC5-28, ST1HY24-9, ST1HY24-20, ST1HY24-39, ST1HY24-60, ST1HY24-85 e ST1HY24-136 foram confirmados, em Northern blot, como sendo regulados por Hy. Além disso, duas outras seqüências já encontradas como diferencialmente expressas inicialmente neste laboratório, que codificam, respectivamente, para a proteína Env do retrovírus tipo C e metalotioneína II, também foram encontradas na biblioteca ST1HY24.

Uma análise inicial da seqüência de DNA do clone ST1HYC5-28 mostrou 70% de identidade a tenascina-X, uma proteína de matriz extracelular. Este clone apresenta um transcrito de aproximadamente 5,7 kb, diferindo do tamanho dos transcritos conhecidos para este gene, que tem ao redor de 13 kb, o que poderia sugerir a identificação de um novo transcrito para essa família de proteínas. O transcrito é dramaticamente induzido por hidrocortisona em células ST1 sem qualquer sinal em células não tratadas, não sendo expresso em células P7, na presença ou na ausência de Hy. A análise cinética da expressão deste mRNA induzido por Hy, em células ST1 mostra um pico de expressão entre 4 e 5 h, sem nenhuma regulação por soro. Além disso, o tratamento com Hy na presença de Chx não bloqueia a indução da sua expressão por Hy, sugerindo que se trata de um gene primariamente regulado durante o tratamento hormonal.

Uma vez que este mRNA é presente somente em células que sofrem reversão do fenótipo transformado e tumoral na presença de Hy, nós tentamos

caracterizar a estrutura deste mRNA e obter um cDNA completo, para analisar a importância do mesmo na reversão fenotípica promovida por Hy nestas células.

O rastreamento da biblioteca de cDNA enriquecida para sequências maiores que 2,3 kb, denominada ST1-LA, permitiu o isolamento de um grande número de clones de tamanho inferior ao mRNA encontrado em Northern blot, refletindo provavelmente, a dificuldade de síntese deste mRNA devido ao alto conteúdo GC da sequência, como inicialmente constatado pela análise da sequência do fragmento subtraído.

A caracterização do clone 8B, de aproximadamente de 5,7 kb (similar ao tamanho do mRNA) entretanto demonstrou que a estrutura do mRNA constitui-se de um motivo bem conservado de fibrinogênio na porção 3', conectado a um arranjo de motivos repetidos similares a fibronectina tipo III até a porção 5'. Esta organização é bastante similar à descrita para o gene XB humano, que codifica para TN-X.

O sequenciamento extensivo do locus humano demonstrou que TN-X era constituído de um domínio amino-terminal seguido por quatro repetições héptide, 18,5 repetições similares a EGF, 29 repetições similares a fibronectina tipo III (Fn) e um domínio carboxi-terminal contendo fibrinogênio (Fbg) (Bristow, et al., 1993). Por outro lado, este fato poderia sugerir que o transcrito correspondente ao clone ST1HYC5-28 fosse um transcrito truncado. Entretanto, a ausência de motivos similares a EGF e da porção héptide, pode sugerir que o cDNA codifique para um variante de TN-X com uma função diferente, o que poderia ser o caso, se fosse considerado a expressão diferencial deste transcrito no contexto de parada de proliferação das células ST1. É provável que outros variantes de TN-X sejam responsáveis por outras funções nas células.

A análise da sequência do cDNA completo pelo programa Signal P, resultou em nenhum peptídeo sinal óbvio, ao contrário do detectado na sequência do gene XB (TN-X humana) e do cDNA de TN-X bovina, o que, por sua vez, poderia sugerir que este mRNA codificaria uma proteína que não seria

exportada para a matriz extracelular. Uma análise na literatura levou à identificação de um único mRNA variante de TN-X, de aproximadamente 2 kb compartilhando a mesma estrutura (TEE, et al, 1995).

A análise da sequência deduzida de aminoácidos do clone 8B prediz uma ORF de 1425 aminoácidos, tendo leucina (CUG) como códon alternativo de iniciação. Essa característica, é da mesma forma, compartilhada com o cDNA XB-S (Tee et al, 1995) que apresenta dois códons possíveis para iniciação da síntese de proteínas. Neste caso, ambos são utilizados para a síntese de proteínas em extratos de tradução "in vitro". Entretanto, apenas uma proteína, iniciada a partir do códon AUG, parece ser reconhecida em Western blot de extratos de proteínas de adrenais de humanos adultos e fetos (Tee et al, 1995).

Nenhuma caracterização funcional do cDNA 8B foi feita neste trabalho utilizando-se extratos de tradução "in vitro".

Uma tentativa de caracterização da expressão em nível de proteína para esse variante de TN-X, ainda depende da obtenção de um anti-soro específico, o qual está sendo preparado, a partir de uma proteína recombinante com a colaboração da aluna de Doutorado Fernanda Ortiz, deste laboratório.

Análises a nível de proteínas, com anticorpos específicos de TN-X tem sido comunicadas na literatura, mostrando que é possível detectar diferentes isoformas para estas proteínas, em diferentes tipos celulares. Uma isoforma de 220 KDa foi descrita em células de glioma 203 sugerindo que uma diversidade (crescente) de isoformas de TN-X, em diferentes tipos celulares, pode refletir funções diferentes e importantes para cada uma delas.

Adicionalmente, nenhum motivo RGD foi encontrado na sequência do cDNA 8B, o que está de acordo com a sequência do clone genômico de TN-X humana publicada (Bristow, et al, 1993). Entretanto, a sequência do cDNA de TN-X bovina recentemente publicada (Elefteriou, 1997) parece conter uma sequência RGD funcional localizada no domínio fnb10. As discrepâncias entre as sequências de TN-X humana e bovina ainda não estão esclarecidas. Por outro

lado, a família de TN-Xs parece ser capaz de mediar as interações entre células e matriz de forma dependente e independente de motivos RGD (Spring et al., 1989).

Apesar de não se ter conhecimento sobre a função deste gene e de suas isoformas truncadas para o controle da proliferação celular, algumas pequenas evidências indiretas tem sido acumuladas sobre a relevância do gene TN-X original. Foi mostrado que TN-X é expressa em nervos periféricos, e além disso, uma observação detalhada em músculos e no coração, sugere que esta proteína tenha um papel relevante na morfogênese e migração celular em tecidos conectivos (Burch et al, 1995).

Apesar do vasto número de mutações localizadas no locus P450c21A c4B, de TN-X, incluindo aquela que origina a hiperplasia adrenal, nenhuma delas sobrepõe o gene XB sugerindo ser uma função essencial para este gene. Camundongos deficientes numa região de 80 kb extendendo o mesmo locus, mas que ainda contém um gene TN-X funcional, só podem ser cruzados na condição heterozigótica, pois a condição homozigótica é letal (Shiroishi et al, 1987).

Do ponto de vista da proliferação celular, a função de TN-X tem sido deduzida de evidências circunstanciais. Tumores originários de células Ren-Ca e 203 de glioma₁ desenvolvidos em camundongos nude, quando analisados por imunohistoquímica, mostram expressão severamente reduzida de TN-X, não somente nas células do tumor transplantado, mas também, no estroma do camundongo hospedeiro. Isto poderia indicar um sinal negativo oriundo das células do tumor, atuando sobre as células do estroma do hospedeiro (Sakai et al, 1996). A ausência de TN-X no estroma do tumor é notável, uma vez que a expressão de TN-X ocorre durante as interações epitélio-mesenquimais do embrião, sugerindo que a repressão de TN-X pode ser um evento crítico durante a tumorigênese ou invasão e metástase de carcinomas (Sakai, et al, 1996).

Uma segunda sequência analisada foi obtida também a partir da primeira biblioteca de cDNA subtraída (clone ST1HYC24). A análise da sequência deste cDNA revelou conter o primeiro exon do proto-oncogene *sno* (*ski*-related novel).

Uma vez que nenhum sinal foi detectado em Northern blot contendo amostras de RNA total, nós utilizamos RT-PCR competitivo semi-quantitativo para determinar o nível de expressão diferencial. A baixa abundância do gene reflete o nível de normalização encontrado na biblioteca ST1HYC5. Foi encontrada uma fraca diminuição (3X) do nível basal, em células crescendo exponencialmente, após 16 h de tratamento com hidrocortisona, retornando ao nível basal após 24h, o que sugere que a subtração deste fragmento de cDNA corresponde a um falso positivo, visto que a biblioteca visava obter sequências induzidas na presença do hormônio. Ainda que a diminuição do transcrito de *sno* possa estar de acordo com a reversão do fenótipo transformado, seria necessário determinar, por completo, o perfil de expressão deste gene, a fim de avaliar se a redução deste transcrito contribui para a reversão do fenótipo.

O proto-oncogene *sno*, da mesma forma que *ski*, pode converter células não musculares de embrião em músculos esqueléticos, porém tem fraca atividade transformante (Boyer et al, 1993). Portanto, é difícil definir até que ponto a expressão de *sno*, na ausência de hidrocortisona contribui para o fenótipo transformado de células ST1.

Como pôde ser visto, o índice de confirmação de sequências reguladas positivamente é de aproximadamente 1:4 na biblioteca ST1HY24. Este número é bastante superior ao encontrado na primeira biblioteca construída (ST1HYC5), provavelmente devido a ausência de cicloheximida no preparo da amostra tester. Alguns destes clones (ST1HY24-60, ST1HY24-9, ST1HY24-20), correspondem a conhecidos inibidores de proliferação celular ou promotores de diferenciação em outros sistemas celulares (ST1HY24-85), sugerindo que são bons candidatos para participar da reversão fenotípica tumoral-normal.

A cinética da expressão destes clones diferencialmente expressos também foi analisada em células ST1 previamente carenciadas para soro e, então, tratadas com hidrocortisona e/ou soro por diferentes períodos de tempo.

A análise dos resultados mostrou que a regulação dos níveis de expressão dos respectivos RNAs por hidrocortisona, foi muito superior ao verificado em células não sincronizadas, o que sugere que o uso de amostras "tester" provenientes de células tratadas com Hy na presença de 0,2 % de soro, poderia ser mais apropriado para o preparo das amostras para subtração, possibilitando assim, uma prevalência ainda maior de clones diferencialmente expressos.

Os genes correspondentes aos clones ST1HY24-9 e ST1HY24-20 são pouco induzidos por soro e altamente induzidos por Hy (74X e 9X o nível basal, respectivamente). Além disso, o aumento induzido por Hy parece prolongar, por mais tempo, os níveis do mRNA de 5 até 12h, pelo menos para os clones ST1HY24-9 e ST1HY24-60 (MKP1). Na condição 0,2% de soro + Hy, os níveis de indução são maiores que em 5% de soro + Hy, sugerindo que os mecanismos de controle destes mensageiros por soro e hidrocortisona são bem diferentes, talvez antagônicos. De fato, a condição 0,2% de soro + Hy leva as células ST1 a um total bloqueio na fase G0/G1 do ciclo celular (Armelin & Armelin, 1983).

A indução de CL100 (MKP1) por soro é bem documentada na literatura (Misra-Press, 1995). MKP1 foi descrito como um gene de resposta imediata a fatores de crescimento, porém que sinaliza o término dos sinais mediados por fatores de crescimento. A super-expressão do gene MKP-1 de camundongo inibe dramaticamente a proliferação de fibroblastos (Sun et al, 1994). MKP1 codifica para uma fosfatase de especificidade dual que catalisa a desfosforilação de MAP quinases em resíduos de treonina e tirosina.

Pode-se dizer que a classe das proteínas de matriz extracelular é a classe de sequências melhor representada, com mais de um integrante. Além disso, os maiores aumentos registrados a nível transcricional entre as sequências

analisadas, são verificados com trombospondina-1 e tenascina-X. É provável que o dramático aumento destas duas sequências, seja refletido nas alterações a nível de citoesqueleto e superfície celular descritas anteriormente em células ST1 tratadas com hidrocortisona (Armelin & Armelin, 1983).

Foi detectada uma expressão muito baixa de todas as sequências analisadas em células P7 e U87 na presença ou ausência de Hy. Este fato e os níveis elevados destas sequências em células ST1 tratadas com Hy, indicam que os genes correspondentes podem ser bons candidatos para compreensão da reversão do fenótipo em células ST1. Os níveis de similaridade entre as sequências de rato e humano aqui analisadas variam entre 86 e 98 %, sugerindo que a ausência dos sinais de hibridização nas amostras de RNA de U87 pode mesmo ser devido a níveis ultra-diminuídos, nesta célula, ao invés da baixa similaridade da sequência usada como sonda. Os níveis de expressão basal de ST1HY24-9 nas células P7 são 95% menores em relação as células ST1, porém tem o mesmo nível de indução em células P7 em crescimento exponencial sob tratamento com Hy. Isso pode sugerir que a capacidade da célula ST1 induzir níveis dramaticamente maiores de alguns transcritos, em relação a célula P7, pode contribuir para a capacidade da célula ST1 de atingir a reversão de fenótipo, em detrimento da célula P7.

A situação não é a mesma para todos os transcritos. Deste modo, os níveis de mRNA do clone ST1HY24-20 são 3,5 X menores nas células P7 em relação as células ST1, entretanto, permanecem inalterados após tratamento com Hy. Além disso, o restante das sequências também apresentou níveis praticamente indetectáveis nas células P7 e U87.

É razoável supor que uma maior capacidade de análise da expressão dos clones oriundos da biblioteca subtraída ainda pode revelar ainda muitas outras sequências diferencialmente expressas. Entretanto, é importante salientar que outras comparações entre perfis de expressão tumoral versus normal, apesar de detectarem ao redor de 100 genes diferencialmente expressos, apenas 1-2%

desse total apresenta mudanças realmente drásticas em seus níveis de expressão, exatamente como mostrado aqui (revisto em Zhang et al, 1997). Isto sugere que a expressão diferencial das sequências detectadas neste trabalho pode representar uma parcela significativa dos genes que tem suas expressão drasticamente alterada pela adição de Hy.

De fato, a metodologia de subtração de cDNAs é bastante apropriada quando a expressão diferencial entre as sequências das populações analisadas encontram-se ao redor de 10 X. Além disso, a vantagem do uso de uma biblioteca subtraída é aumentar a prevalência de genes diferencialmente expressos de modo a encontrá-los numa frequência tal, na biblioteca, que um rastreamento ao acaso seja suficiente para encontrá-los.

Por outro lado, a detecção das alteração de um número tão grande de genes na célula (100-200), frente a determinados estímulos, apresenta agora uma chance de ser inicialmente revelada através do monitoramento simultâneo de milhares de genes utilizando-se a metodologia de microarranjos de cDNA (Schena et al, 1995).

O presente trabalho adiciona uma lista de genes, cuja regulação por glicocorticóides é desconhecida na literatura, aos genes regulados por GC já previamente isolados neste laboratório no modelo celular ST1.

No momento, espera se focalizar sobre a confirmação da expressão diferencial de clones, cujas sequências não possuem similaridade em bancos de dados e avaliar sua potencial atividade supressora de tumor.

Além disso, a proporção de genes raros e abundantes e a prevalência de genes diferencialmente expressos nas bibliotecas normalizadas de cDNAs subtraídos apresentadas aqui, seriam material de preferência para análise pela metodologia de microarranjos de cDNA para a obtenção de um perfil mais completo de genes regulados por GC.

5. CONCLUSÕES

A metodologia de subtração de cDNAs por PCR supressivo possibilitou a construção de duas bibliotecas de cDNAs subtraídos, para analisar a expressão gênica diferencial entre células ST1 tratadas com hidrocortisona e não tratadas.

As duas bibliotecas de cDNAs tem boa prevalência de mRNAs raros, o que indica que razoáveis níveis de normalização foram alcançados, contribuindo para aumentar a probabilidade de encontrar genes novos.

O uso de cicloheximida no preparo da amostra "tester" da biblioteca ST1HYC5 provocou o aumento da expressão de uma série de genes que não são regulados por hidrocortisona.

Análise da expressão de algumas das sequências presentes nas duas bibliotecas, permitiu a identificação de 7 genes diferencialmente expressos: tenascina-X, trombospondina-1, ciclina G, tirosina fosfatase CL100, NRP/B, folistatina e PP2A.

A maioria das sequências tem conhecido envolvimento na controle da proliferação celular e/ou diferenciação em outros sistemas celulares estudados, o que sugere que os genes isolados são bons candidatos para explicar a reversão de fenótipo tumoral de células ST1 promovida por hidrocortisona.

A regulação da expressão destes genes por glicocorticóides não havia, até então, sido relatada, portanto, este trabalho revelou novos genes regulados por este agente anti-tumoral.

O clone que codifica para TN-X apresentou um mRNA altamente induzido na presença de hidrocortisona, porém de tamanho destoante em relação aos outros membros da família TN-X. O cDNA completo deste transcrito foi isolado e sequenciado, revelando que é constituído apenas de motivos de fibronectina tipo III e fibrinogênio.

A caracterização deste novo mRNA de TN-X também mostrou que ele provavelmente não origina uma proteína de matriz extracelular, uma vez que nenhum peptídeo sinal foi encontrado. Há possibilidades deste mRNA codificar para uma proteína TN-X de função diferente das demais.

De um modo geral, a maioria dos genes isolados tem a expressão basal bastante diferente entre células ST1 e P7. Além disso, a indução dramática de todas as sequências é verificada em células ST1, e não em células P7, que são incapazes de reverter seu fenótipo na presença de hidrocortisona, reforçando o possível papel de seus produtos na reversão fenotípica de células ST1.

A prevalência de transcritos raros e diferencialmente expressos na biblioteca ST1HY24, permitiu o isolamento de diversos genes regulados por GC numa análise em pequena escala, sugerindo que a biblioteca poderia revelar um número bem maior de genes e de forma mais rápida se analisada através da metodologia de microarranjos de cDNA ("DNA microarrays").

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERBLOM, I.; SLATER, E.; BEATO, M.; BAXTER, J.; MELLON, P. (1988). Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. *Science* 241: 350-353.
- ARMELIN, M. C. S.; ARMELIN, H. A. (1983). Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth of rat glioma cells. *Journal of Cell Biology* 97: 459-465.
- ARMELIN, M. C. & ARMELIN, H. A (1978). Steroid hormones mediate reversible phenotypic transition between transformed and untransformed states in mouse fibroblasts. *PNAS* 75(6): 2805-2809.
- ARMELIN, M. C. S.; STOCCO, R.; ARMELIN, H. A.(1983). Control of rat C6 glioma cell proliferation: Uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. *The Journal of Cell Biology* 97: 455-458.
- AUPHAN, N.; DIDONATO, J.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARIN, M. (1995). Immunosuppression of glucocorticoids: Inhibition of NF-Kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270: 283-286.
- BAXTER, J.; HARRIS, A.; TOMKINS G.; CHON, M. (1971). Glucocorticoid receptors in lymphoma cells in culture: relationship to glucocorticoid killing activity. *Science* 171(967): 189-191.
- BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-857.
- BEATO, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344.
- BEATO, M.; ARNEMANN, J.; CHALEPAKIS, G.; SLATER, E.; WILLMANN, T. (1987). Gene regulation by steroid hormones. *Journal of Steroid Biochemistry* 27: 9-14.
- BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371.
- BODWELL, J.; ORTI, E.; COULL, J.; PAPPIN, D.; SMITH, L.; SWIFT, F. (1991). Identification of phosphorylation sites in the mouse glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry* 266: 7549-7555.

- BODWELL, J.; WEBSTER, J.; JEWELL, C.; CIDLOWSKI, J.; HU, J-M.; MUNCK, A. (1998). Glucocorticoid receptor phosphorylation: Overview, function and cell cycle-dependence. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65(1-6): 91-99.
- BODWELL, J.; HU, L-M.; HU, J-M.; ORTI, E.; MUNCK, A. (1993). Glucocorticoid receptors: ATP-dependent cycling and hormone-dependent hyperphosphorylation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 47: 31-38.
- BOYER, P.; COLMENARES, C.; STAVNEZER, E.; HUGHES, S. (1993). Sequence and biological activity of chicken *snoN* cDNA clones. *Oncogene* 8: 457-466.
- BRISTOW, J.; TEE, M.; GITELMAN, S.; MELLON, S.; MILLER, W. (1993). Tenascin-X: A novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *The Journal of Cell Biology* 221 (1): 265-278.
- BURCH, G.; BEDOLLI, M.; McDONOUGH, S.; ROSENTHAL, S.; BRISTOW, J. (1995). Embryonic expression of tenascin-X suggests role in limb, muscle and heart development. *Developmental dynamics* 203: 491-504.
- CARVALHO, L.; ARMELIN, M. C. S. (1997). Reversão fenotípica (tumoral-nromal) induzida por hormônios glicocorticóides: bases moleculares. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 81pg.
- CHIBA, H.; MURAMATSU, M.; NOMOTO, A.; KATO, H. (1994). Two human homologs of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SWF2 and *Drosophila* Brahma are transcriptional co-activators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Research* 22(10) 1815-1820.
- CHIRGWING, J.; AIYBLE, A.; McDONALD, R.; RUTTER, W. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 8: 5294-5299.
- DAHLMAN-WRIGHT, K.; WRIGHT, A.; GUSTAFSSON, J. A.; CARLSTEDT, J. (1991). *Journal of Biological Chemistry* 266: 3107-3112.
- DENIS, M.; CHADENEAU, C.; BLANCHARDIE, P.; LUSTENBERGER, P. (1992). Biological effects of glucocorticoid hormones on two rat colon adenocarcinoma cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 41(3-8): 739-745.

- DeRISI, J.; PENLAND, L.; BROWN, P.; BITTNER, M.; MELTZER, P.; RAY, M.; CHEN, Y.; SU, Y.; TRENT, J. (1996). Use of cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature genetics* 14(4): 457-460.
- DIEKEN, E.; MIESFELD, R.; (1992). Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N-terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 12(2): 589-597.
- DONG, Y.; POELLINGER, L.; GUSTAFSSON, J.; OKRET, S. (1988). Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Molecular Endocrinology* 2(12): 1256-64.
- DROMS, K.; HANSON, L.; MALKINSON, A.; BEER, D. (1993). Altered dexamethasone responsiveness and loss of growth control in tumorigenic mouse lung cell lines. *International Journal of Cancer* 53(6): 1017-1022.
- DROUIN, J.; SUN, Y.; CHAMBERLAND, M.; GAUTHIER, Y.; DE LEAN, A.; NEMER, M.; SCHMIDT, T. (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO Journal* 12(1) 145-156.
- DUGUID, J. ; DINAUER, M. (1990). Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Research* 18: 2789-2792.
- DUGUID, J. ; ROHWER, R.; SEED, B. (1988). Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *PNAS* 85(15): 5738-5742.
- DURST, M.; GALLAHAN, D.; JAY, G.; RHIM, J. (1989). Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology* 173(2): 767-771.
- EASTMAN-RECKS, S. VEDECKIS, W. (1986). Glucocorticoid inhibition of c-myc, c-myb, c-Ki-ras expression in mouse lymphoma cell line. *Cancer Research* 46: 2457-2462.
- ELEFTERIOU, F.; EXPOSITO, J.; GARRONE, R.; LETHIAS, C. (1997). Characterization of the bovine tenascin-X. *Journal of Biological Chemistry* 272, 36: 22866-22874.

GALILI, U. (1983). Glucocorticoid induced cytolysis of human normal and malignant lymphocytes. *Journal of Steroid Biochemistry* 19 (1B): 483-490.

GODOWSKI, P.; PICARD, D.; YAMAMOTO, K. (1988). Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* 241(4867): 812-816.

GURSKAYA, N.; DIATCHENKO, L.; CHENCHIK, A.; SIEBERT, P.; KHASPEKOV, G.; LUKYANOV, K.; VAGNER, L.; ERMOLAEVA, O.; LUKYANOV, S.; SVERDLOV, E.; (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Analytical biochemistry* 240: 90-97.

HARA, E.; KATO, T.; NAKADA, S.; SEKIYA, S.; ODA, K. (1991). Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Research* 19: 7097-7104.

HAWLEY, R.; LIEU, F.; FONG, A.; HAWLEY, T. (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene therapy* 1: 136-138.

HECK, S.; KULLMAN, M.; GAST, A.; PONTA, H.; RAHMSDORF, H.; HERRLICH, P.; CATO, A.; (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO Journal*: 13: 4087-4095.

HEERY, D.; KALKHOVEN, E.; HOARE, S.; PARKER, M. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733-736.

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 Journal* 14(3): 452-460.

HONG, H.; KHOLI, K.; TRIVEDI, A.; JOHNSON, D.; STALLCUP M. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of the steroid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 4948-4952.

- HUBANK, S.; SCHATZ, D.; (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research* 22: 5640-5648.
- JANTZEN H.; STRAHLE, U.; GLOSS, B.; STEWART, F.; SCHIMDT, W.; BOSHART, M.; MIKSICEK, R. (1987). Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49(1): 29-38.
- JOAZEIRO, C.; ARMELIN, M.C.(1990). Oncogene *fos*: Transformação celular e modulação da resposta de células Balb-3T3 a reguladores de crescimento. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 93 pg.
- JONAT, C.; RAHMSDORF, H. J.; PARK, K.; CATO, A.; GEBEL, S.; PONTA, H.; HERRLICH, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62: 1189-1204.
- KAWARA, R.; DENG, A.; DEUEL, T. (1991). Glucocorticoids inhibit the transcriptional induction of JE, a platelet-derived growth factor-inducible gene. *Journal of Biological Chemistry* 266: 13261-13266.
- LIANG, P.; PARDEE, A. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- MEYER, M-E.; GRONEMEYER, H. TURCOTTE, B.; BOCQUEL, M-T; TASSET, D.; CHAMBON, P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57: 433-442.
- MISRA-PRESS, A.; RIM, C.; YAO, H.; ROBERSON, M.; STORK, P. (1995). A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (24): 14587-14596.
- NAVIAUX, R. CONSTANZI, E.; HAAS, M.;VERMA, I. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper free, high titer, recombinant retrovirus. *Journal Virology* 70(8): 5701-5705.
- NORMAN, M.; THOMPSON, E. (1977). Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line. *Cancer Research* 37(10): 3785-3791.
- ONATE, S.; TSAI, S.; TSAI, M.; O'MALLEY, B. (1995). Sequence and characterization of a co-activator for the steroid receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357.

- OAKLEY, R.; MADHABANANDA, S.; CIDLOWSKI, J. (1996). The human glucocorticoid receptor β isoform. *Journal of Biological Chemistry* 271(16): 9550-9559.
- OKAYAMA, H.; BERG, P. (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Molecular and Cellular Biology* 2: 161-170.
- OIKARINEN, A.; KYLMANIEMI, M.; AUTIO-HARMAINEN H.; AUTIO, P.; SALO, T. (1993) Demonstration of kDa 72 and 92 Kda forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease topical glucocorticoids. *Journal of Investigation in Dermatology* 101(2): 205-210.
- PAPOULAS O.; BEEK, S.; MOSELEY, S.; McCALLUM, C.; SARTE, M.; SHAERN, A.; TAMKUN, J. (1998). The *Drosophyla trithorax* group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125: 3955-3966.
- PARILLO, J.; FAUCI, A (1979). Mechanisms of glucocorticoid action on immune process. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 19: 179-209.
- PETTERSON, C.; DINGWALL, A.; SCOTT, M. (1994). SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA* 91: 2905-2908.
- RAMEH, L.; ARMELIN, M. (1992). Downregulation of JE and KC genes by glucocorticoids does not prevent the G0-G1 transition in Balb/3T3 cells. *Molecular and Cellular Biology* 12: 4612-4621.
- REICHART, H.; KAESTNER, K. H.; TUCKERMAN, J. (1998). *Cell* 93: 531-541.
- RIVA, M.; 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. *Journal of Neurochemistry* 64: 2526-2533.
- SCHENA M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P.O.(1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA. *Science* 270: 467-470.

SAKAI, T.; FURUKA, Y.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; NAKAMURA, M.; KITAGAWA, S.; IKEMURA, T.; MATSUMOTO, K. (1996). Tenascin-X expression in tumor cells and fibroblasts: glucocorticoids as a negative regulators in fibroblasts. *Journal of Cell Science* 109: 2069-2077.

SASAHARA, R.; ARMELIN, M. C. S (1995). Efeito anti-tumorigênico de hormônios glucocorticóides sobre células C6 de glioma de rato: bases moleculares. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 93 pag.

SHIROISHI, T.; SAGAI, T.; NATSUUME-SAKAI, S.; MORIWAKI, K. (1987). Lethal deletion of the complement component C4 and steroid 21-hydroxylase genes in mouse H-2 class III region, caused by meiotic recombination. *PNAS* 84: 2819-2823.

SIEBERT, P.; CHENCHIK, A.; KELLOGG, D.; LUKYANOV, K.; LUKYANOV, S. (1995). An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 23: 1087-1088.

SMITH, C.; ONATE, S.; TSAI, M.; O'MALLEY, B. (1996). CREB-binding protein acts synergistically with steroid receptor co-activator 1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 8884-8888.

SPENCER, T.; JENSTER, G.; BURCIN, M.; ALLIS, C.; ZHOU, J.; MIZZEN, C.; McKENNA, N.; ONATE, S.; TSAI, S.; TSAI, M.; O'MALLEY, B. (1997). Steroid receptor co-activator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389: 194-198.

STER M.; JENSEN, R.; HERSKOWITZ, I. (1984). Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *Journal of Molecular Biology* 178: 853-868.

STRAWHECKER, J.; PELLING, J. (1992). Inhibition of mouse skin tumorigenesis by dexamethasone occurs through a Ha-ras-independent mechanism. *Carcinogenesis* 13(11): 2075-2080.

SUN, H.; TONKS, N.; BAR-SAGI, D. (1994). Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP1. *Science* 266: 285-288.

- TCHERNITSA, O.; ZUBER, J.; SERS, C.; BRINCKMANN, R.; BRITSCH, S.; ADAMS, V.; SCHAFER, R. (1999). Gene expression profiling of fibroblasts resistant toward oncogene-mediated transformation reveals preferential transcription of negative growth regulators. *Oncogene* 18: 5448-5454.
- TEE, M.; THOMSON, A.; BRISTOW, J.; MILLER, W. (1995). Sequences promoting the transcription of the human XA gene overlapping P450c21A correctly predict the presence of a novel, adrenal-specific, truncated form of tenascin-X. *Genomics* 28: 171-178.
- TORCHIA, J.; ROSENFELD, M. (1998). Co-activators and co-repressors, in the integration of the transcriptional responses. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 373-383.
- TRUSS, M.; BARTSCH, J.; HACHE, R.; BEATO, M. (1993). Chromatin structure modulates transcription factor binding to the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 47(1-6): 1-10.
- VALENTINI, S.; ARMELIN, M. (1996). Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *Journal of Endocrinology* 148 11(1): 11-17.
- VANDERBILT, J.; MIESFELD, R.; MALER, B.; YAMAMOTO, K. (1987). Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Molecular Endocrinology* 1(1): 68-74.
- VELCULESCU V.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.
- VIVANCO, M.; JOHNSON, R.; GALANTE, P.; HANAHAN, D.; YAMAMOTO, K. (1995). A transition in transcriptional activation by the glucocorticoid and retinoic acid receptors at the tumor stage of dermal fibrosarcoma development. *EMBO Journal*, 14(10): 2217-2228.
- YANG-YEN, H.; CHAMBARD, J.; SUN, Y.; SMEAL, T.; SCHIMIDT, T.; DROUT, J.; KARIN, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62: 1205-1215.
- YAMAMOTO, K. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes gene networks. *Annual Review Genetics* 19: 209-252.

YOSHINAGA, S.; PETERSON, C.; HERSKOWITZ, I.; YAMAMOTO, K. (1992). Roles of SWI1, SWI2 and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* 258: 1598-1604.

ZHANG, L.; ZHOU, W.; VELCULESCU, V. KERN, S.; HRUBAN, R.; HAMILTON, S.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272.

ZHAO, K.; WANG, W.; RANDO, O.; XUE, Y.; SWIDEREK, K.; KUO, A.; CRABTREE, GR (1998). Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI-SNF like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95 (5): 625-636.