UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

O PAPEL DAS PROTEÍNAS RAS EM CÉLULAS
ADRENOCORTICAIS Y-1 E NA TRANSDUÇÃO DO SINAL DE
ACTH

MÍRIAM SANTOS DE MORAES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Orientador Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

SÃO PAULO

Julho de 2002

“O Papel das Proteínas Ras em Células Adrenocorticais Y1 e na Transdução do Sinal de ACTH”

MIRIAM SANTOS DE MORAES

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

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

Prof. Dr. HUGO PEQUENO MONTEIRO
HEMOCENTRO

Profa. Dra. MARIA APARECIDA NAGAI
FM – USP

SÃO PAULO
05 DE SETEMBRO 2002.

Aos meus pais, Antônio e Maria Anita; ao Márcio, meu marido; à pequena Luiza, nossa filha;

A todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Prof. Hugo que ao permitir que eu me juntasse ao seu grupo contribuiu tanto para o meu aprendizado intelectual quanto para o meu desenvolvimento como pessoa.

Ao Prof. Armando Ventura que me iniciou no misterioso mundo da pesquisa e ensinou-me que para fazer ciência é necessário ter paciência.

Aos colegas de laboratório, Kátia Maria Rocha, Ivan Tadeu Rebustini, Fábio Luiz Forti, Érico Tozzoni Costa e Paula Asprino, Alexandre Demargos, Carolina Bigarella, Gilson Murata, pelas discussões construtivas, pelos momentos divertidos, pela ajuda, pelo companheirismo, pela presença constante e pacífica.

A querida Telma que em tão pouco tempo mostrou-se uma amiga inestimável, cuja ajuda emocional e técnica foi de importância fundamental.

À Kátia, que como uma caixa de surpresa, surpreendeu com seu conteúdo de valor inigualável e de grande ajuda em todos os momentos.

Ao Érico e à Paula, que mesmo aqui não podem ser separados, pela alegria e apoio constantes, pela ajuda com o computador.

À Ana Paula, por seu exemplo de dedicação e paciência, pelo carinho e ajuda nos experimentos com Myc.

Ao Ivan por seu incentivo constante e otimismo; por fazer-me rir.

Ao Alexandre por "salvar-me" sempre que o computador cismava em desafiar-me (ganhando, claro, na maioria das vezes).

À Carol pela ajuda nos experimentos, pela "saudades das minhas células" que ainda agora me faz rir.

À D. Maria, que além de ser um exemplo de trabalho bem feito, tanto animou as nossas horas com o seu jeito "português" de ser.

Aos meus pais e irmãos, sem os quais nada disso seria possível.

Ao Márcio por ter me ensinado a ter fé, pois muito do que nos move em ciência é nossa fé pelo que fazemos.

A pequena Luiza pela paciência e pelos muitos momentos que lhe foram roubados enquanto eu perseguia um sonho.

A todos os amigos que embora distantes (Aufra, Claudia, Eliza), sempre tiveram uma palavra amiga de incentivo.

Aos Professores Mari Sogayar, Ohara Augusto, Bianca Zingales, Ronaldo Bento, seus técnicos e alunos pela ajuda com reagentes e equipamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, pelo suporte a este projeto e pela concessão de minha bolsa de estudos.

A todo o pessoal da biblioteca, da secretária de Pós-Graduação, dos equipamentos audiovisuais, da informática e xerox pela atenção e serviços prestados.

A todos os funcionários do Instituto que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

A FAPESP pelo suporte a este projeto e pela bolsa concedida, processo número 98/10231-8.

Índice

Resumo	8
Lista de Abreviações.....	9
Introdução	11
Transição da fase G0 para a fase S.....	13
Ras é o ponto de convergência para diversas vias de sinalização.....	15
Requerimento de Ras durante a transição G0/S.....	16
Ras atua através de múltiplas moléculas efetoras.....	16
A via da Proteína Quinase A (PKA)	17
Interação entre vias de transdução de sinal - vias ativadas por receptores tirosina quinase e vias ativadas por receptores acoplados a proteínas G.....	18
Genes envolvidos no Controle da Progressão Celular.....	21
O gene c-myc.....	22
O gene c-fos	26
Y-1, um Modelo para Estudos sobre ACTH.....	26
A Linhagem Celular Y-1.....	26
O Hormônio ACTH	28
A proteína dominante negativa RasN17	29
Objetivos	32
Plano Experimental	32
Materiais e Métodos	33
Materiais.....	33
Materiais.....	34
A linhagem celular Y-1	34
A linhagem celular Y13-259	34
Plasmídeos.....	34
Anticorpos.....	35
Hormônios, Fatores de Crescimento e Outros Peptídeos	36
Inibidores de Fosfatase ou Protease.....	36
KITS	36
Drogas e Antibióticos	37
Soro e meio de cultura	37
Soluções	37
Isótopos radioativos	39
Enzimas	39
Oligonucleotídeos.....	39
Métodos.....	41
Cultura Celular.....	41
Análise de Entrada em S por Incorporação de BrdU	41
Obtenção do anticorpo monoclonal anti-ras Y13-259.....	43
Preparação de GST-RDB.....	44

Extração de Proteína Total.....	45
Precipitação de Ras-GTP.....	46
SDS-PAGE.....	46
Western-Blot.....	46
Ensaio de Imunocitoquímica	48
Extração de RNA total e Northern Blot	49
Marcação de Sonda Radioativa	49
Hibridização	50
Sistema de Expressão Tet-On (Clontech).....	50
Transfecção de células Y-1	52
Transformação de Bactérias por Choque Térmico:	52
Preparação de DNA Plasmidial.....	53
Obtenção de Fragmentos de Plasmídeos para Preparação de Sonda.....	53
Sequenciamento	54
Teste de qui-quadrado	54
Resultados.....	55
Caracterização dos vetores que expressam a proteína dominante negativa H-ras Asn17 (RasN17)	55
Caracterização dos vetores que expressam a proteína dominante negativa H-ras Asn17 (RasN17)	56
Efeitos de RasN17 sobre o crescimento de células Y-1	58
Caracterização da expressão da proteína mutante H-ras Asn-17 em subclones celulares de Y-1.	62
Detecção específica de Ras-GTP por Gst-RBD.....	66
Regulação da atividade de ERK1 e ERK2 por FGF-2 e ACTH	69
Expressão de Myc em subclones de Y-1 após a transfecção da proteína dominante negativa RasN17	72
Expressão de c-fos em subclones de Y-1.....	76
Efeito de RasN17 sobre a progressão no ciclo celular de células Y-1... ..	78
Discussão	82
Conclusões	87
Referências Bibliográficas	89
Curriculum Vitae.....	97

Resumo

Células Y-1 apresentam o gene K-ras amplificado, o que resulta em altos níveis de expressão da proteína codificada por este gene. Este fato faz com que células Y-1 apresentem níveis cronicamente altos de K-Ras-GTP. Além disso, estas células apresentam uma relativa desregulação da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$, a qual é caracterizada por uma porcentagem de células entrando na fase S do ciclo celular na condição carenciada; e também, por um afrouxamento na regulação de Myc, o qual apresenta níveis basais significantes de mRNA e proteína. Para verificar se existe uma relação entre K-Ras-GTP elevado e os níveis basais de Myc e a desregulação na transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$, células Y-1 foram transfectadas com uma forma dominante negativa de H-ras, H-ras Asn-17 (RasN17). Os transfectantes resultantes também foram utilizados para verificar o papel de Ras na transdução do sinal iniciado por FGF-2 e ACTH. Com estes clones foi possível verificar uma redução nos níveis de ativação de K-Ras na condição carenciada, e com isso ficou claro que FGF-2 e ACTH são capazes de induzir a ativação de K-Ras, porém com cinética diferentes: uma ativação tardia e lenta para FGF-2, e rápida e transiente para ACTH. Com a redução nos níveis de Ras-GTP, verificamos uma concomitante redução no basal da proteína c-Myc e também no basal de entrada em S, indicando que existe uma correlação entre estes fatores. Além disso, os clones Y1-RasN17 foram determinantes para mostrar que em células Y-1 a presença de Akt/PKB constitutivamente ativada é consequência dos níveis cronicamente elevados de K-Ras-GTP (Forti et al, 2002).

Lista de Abreviações

ACTH Hormônio Adrenocorticotrópico

ATP Trifosfato de Adenosina

BrdU Bromo-deoxiuridina

cAMP Monofosfato de Adenosina Cíclico

cDNA Ácido dextribonucleico complementar

DAB Diaminobenzidina

DAPI 4', 6-diamino-2-fenilindol

dCTP Trifosfato de deoxicitosina

DMEM "Dubecco's Modified Eagle's Medium"

DMSO Dimetil Sulfóxido

DNA Ácido Dextribonucleico

DTT Ditioneitol

EGF "Epidermal Growth Factor"

ERK Quinase Regulada por Sinal Extracelular

FCS "Fetal Calf Serum"

FGF-2 "Fibroblast Growth Factor-2"

GAP Proteína Ativadora de GTPase

GAPDH "Gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"

G α e G $\beta\gamma$ subunidades α e $\beta\gamma$, respectivamente, de proteínas G heterotriméricas

GDP Difosfato de Guanosina

GEF Fator de Troca para Nucleotídeos Guanina

GM-CSF "Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor"

GPCR Receptor Acoplado a Proteína G

GST Glutathione S-Transferase

GTP Trifosfato de Guanosina

I κ B Inibidor de NF- κ B

IGF "Insuline- like Growth Factor"

kb Kilobase

Kda Kilodalton

MAPK Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

mRNA Ácido Ribonucleico Mensageiro

MEK Proteína Quinase de MAPK

NF- κ B Fator Nuclear- κ B

NGF "Nerve Growth Factor"

PAGE "Polyacrylamide Gel Electrophoresis"

PBS "Phosphate Buffered Saline"

PDGF "Platelet Derived Growth Factor"

PI3K "Phosphatidylinositol 3-kinase"

PKA Proteína Quinase Dependente de cAMP

PKB ou Akt Proteína Quinase B

PKC Proteína Quinase C

PMSF "Phenyl methyl sulfony fluoride"

Proteína G Proteínas que se ligam a GTP

Ptx toxina de pertussis

SDS Sódio Dodecil Sulfato

Ser Serina

Sos "Son of Sevenless"

TGF "Transforming Growth Factor"

Thr Treonina

TPA 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato, ativador de PKC

V Volts

Introdução

Nos metazoários, uma das decisões mais críticas que toda célula deve tomar é se continua outro ciclo de divisão celular ou se sai do ciclo celular e alcança um estado de quiescência (o qual pode ser transitório). As células podem ainda sofrer citodiferenciação ou apoptose.

O ciclo celular é dividido em quatro fases (Norbury and Nurse, 1992). Durante duas destas fases, as células executam os dois eventos básicos da divisão celular: geração de uma única e exata cópia de seu material genético (a fase sintética ou S) e a repartição de todos os componentes celulares entre duas células filhas idênticas (fase mitótica ou M). As duas outras fases do ciclo celular - G1 e G2 - representam períodos durante os quais as células se preparam para completarem as fases S e M, respectivamente, com sucesso. Quando as células param de proliferar, seja devido a sinais anti-mitogênicos específicos, ou a ausência de sinais mitogênicos apropriados, elas saem do ciclo celular e entram em uma fase de não divisão (estado quiescente) conhecido como G0.

Esforços consideráveis voltados na tentativa de elucidar as vias de sinalização celular que controlam proliferação têm identificado as proteínas Ras e Myc como dois componentes críticos para o controle do crescimento celular normal. Além disso, vários estudos sobre eventos oncogênicos que rompem com a regulação do crescimento celular normal têm revelado uma freqüente alteração em Ras e Myc o que melhor sugere a existência de uma relação sinérgica entre estas duas proteínas. Porém, apesar de todos os esforços, a maneira precisa pela qual as vias controladas por estas proteínas poderiam estar atuando para regular o crescimento celular ainda é pobremente entendido.

Transição da fase G0 para a fase S

Quando células em cultura são plaqueadas em baixa densidade em meio contendo soro, elas movem-se através das quatro fases do ciclo celular: G1, S, G2 e M. Cada uma destas fases é regulada pela ação coordenada de quinases e proteases (King et al, 1996). Por outro lado, quando carenciadas para soro, as células continuam a ciclar até que completam a mitose, de onde elas saem, entrando em um estado de quiescência (Pardee, 1989). Esta condição é freqüentemente chamada de fase G0. Uma vez que os mitógenos tornam-se novamente disponíveis para as células quiescentes, elas retomam o ciclo celular em uma maneira sincrônica. Durante este processo de re-entrada, os mitógenos são requeridos somente até um ponto localizado entre o meio e o final da fase G1. Além deste ponto, as células podem completar um ciclo de divisão celular sem a presença de fatores de crescimento. Em outras palavras, neste ponto a célula "toma a decisão" de completar o resto do ciclo celular e produzir células filhas. Este ponto de comprometimento é conhecido como ponto de restrição (Pardee, 1974; Zetterberg, 1995).

Qual é a base molecular do ponto de restrição? Após a ligação do ligante, os receptores para fatores de crescimento dimerizam-se e fosforilam resíduos de tirosina presentes em seus domínios citoplasmáticos. Estes resíduos de tirosina fosforilados recrutam moléculas sinalizadoras para a membrana. Entre as moléculas recrutadas estão os fatores de troca de nucleotídeos para a proteína Ras (Ras-GEF), os quais promovem a ligação desta proteína a GTP. A forma ligada a GTP de Ras sinaliza para múltiplos efetores abaixo dela, incluindo a via das MAPKs. Esta e outras vias, resultam na fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb). Este é o evento que, atualmente, define o ponto de restrição. Pelo menos duas classes de quinases colaboram para a completa fosforilação de Rb (complexos ciclinaD/CDK4

e ciclina E/CDK2), o que resulta na liberação dos fatores de transcrição da família E2F. Esta classe de fatores de transcrição dá início aos eventos subsequentes necessários para a transição através das outras fases do ciclo celular.

O mecanismo de ação de fatores de crescimento e hormônios na indução de transcrição gênica envolve o reconhecimento, a ligação e ativação de receptores transmembranares específicos, entre os quais dois tipos principais se destacam. Os receptores com atividade de tirosina quinase (RTKs) e os receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas.

Os receptores com atividade de tirosina quinase (RTKs) são reconhecidos por fatores de crescimento, como FGF-2. Estes receptores estão envolvidos no controle de aspectos fundamentais da fisiologia celular, os quais incluem migração celular, sobrevivência, crescimento, proliferação e diferenciação.

Outro tipo de receptor, o qual é reconhecido por hormônios (por exemplo, ACTH), é o receptor de sete hélices (assim conhecido por possuírem sete domínios transmembranares) ou receptor acoplado a proteína G heterotrimérica (GPCR). Esta classe de receptores transmite o sinal do ligante para dentro da célula por meio de interações com uma classe de proteínas que se ligam a GDP/GTP, conhecidas como proteínas G heterotriméricas, daí o nome de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas ou GPCR. Apesar dos efeitos destes receptores sobre o metabolismo intermediário ter sido extensivamente estudado, somente, recentemente, têm-se sugerido que estes receptores também têm importante papel na regulação do crescimento e diferenciação celular.

Ambos os tipos de receptores são capazes de ativar ou inibir inúmeras vias de transdução de sinal, alterando o fenótipo da célula através do controle da expressão diferencial de genes.

Ras é o ponto de convergência para diversas vias de sinalização

A família de genes Ras, em mamíferos, é composta por três membros: H-ras, K-ras e N-ras. Os genes H-ras e K-ras são os correspondentes celulares dos genes virais Harvey e Kirsten, respectivamente, e o gene N-ras foi originalmente identificado em uma linhagem celular humana de neuroblastoma. Os três genes ras em mamíferos codificam para 4 GTPases altamente relacionadas entre si de 188 (K-RasB) ou 189 (H-Ras, K-RasA e N-Ras) aminoácidos. As formas A e B de K-Ras são geradas por "splicing" alternativo dos 4 exons deste gene (Barbacid, 1987). Todos os domínios críticos para a função de Ras (incluindo a seqüência para ligação de nucleotídeos e hidrólise de GTP) estão presente dentro dos 165 aminoácidos no lado N-terminal (Lowy and Willumsen, 1993). Baseado em comparações entre as seqüências primárias dos membros da família, as proteínas Ras podem ser vistas como contendo três regiões contíguas. A primeira região compreende 86 aminoácidos na porção N-terminal, os quais são 100% idênticos entre as diferentes proteínas Ras. Dentro desta região encontra-se o domínio de ligação a moléculas efetoras (aminoácidos 32 - 40), o qual é sítio de interação para todos os alvos conhecidos de Ras. Os 80 aminoácidos seguintes definem uma segunda região onde as proteínas Ras divergem ligeiramente entre si, exibindo uma homologia de 85% entre qualquer par de proteínas. A seqüência C-terminal restante, conhecida como região hipervariável, inicia-se no aminoácido 165 e não apresenta nenhuma similaridade de seqüência entre as proteínas Ras, exceto para o motivo CAAX (C, cisteína, A, aminoácido alifático, X, metionina ou serina) localizado na extremidade C-terminal, o qual está presente em todas as proteínas Ras e dirige o processamento pós-traducional (Hrycyna and Clarke, 1992).

A família de proteínas Ras tem um papel crítico no controle do crescimento celular, bem como é um componente central nos eventos de sinalização mitogênica. A ativação de Ras inicia uma complexa rede de vias de transdução de sinal incluindo a via Raf/MAPK, primariamente envolvida na sinalização para proliferação celular induzida por mitógeno (Seger and Krebs, 1995); a via de PI3 quinase/Akt, a qual está envolvida na sinalização para sobrevivência celular (Kauffmann-Zeh et al, 1997); a via de Rac/Rho, envolvida na remodelagem do citoesqueleto (Lamarche et al, 1996); e as vias de Rac/JNK e Rac/p38, ambas parecendo estarem envolvidas em respostas a estresse, inibição de crescimento e sinais apoptóticos (Minden et al, 1995; Xia et al, 1995). A ativação das vias de Ras mostrou ser essencial para que as células saiam do estado de quiescência e passem através da fase G1 do ciclo celular (Peeper et al, 1997).

Requerimento de Ras durante a transição G0/S

Foi mostrado que Ras tem um papel crítico em múltiplos pontos durante a transição G0/S. Análise bioquímica detectou dois picos de atividade de Ras em células progredindo da fase G0 para S. O primeiro pico é detectado logo após estímulo por soro, e o segundo pico entre o meio e o final da fase G1 (Sato et al, 1990; Taylor and Shalloway, 1996). Análise biológica também indicou a necessidade de Ras em vários pontos durante a re-entrada no ciclo celular de células que se encontram quiescentes (Dobrowolski et al, 1994).

Ras atua através de múltiplas moléculas efetoras

A via de Ras participa de diversos processos, tais como, proliferação celular, diferenciação, transformação e apoptose. Receptores regulam

Ras através de fatores de troca de nucleotídeos, tais como a proteína, "Son of sevenless" (Sos) que converte Ras-GDP em Ras-GTP, e através de proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) que facilitam a hidrólise de GTP a GDP, inativando Ras. A forma ligada a GTP de Ras atua por sua ligação preferencial a algumas moléculas efetoras, mais notavelmente c-Raf-1, uma quinase de serina/treonina. A Ativação de Raf-1 inicia uma cascata de quinase a partir de MEK ("mitogen-activated protein kinase" - MAPK), uma proteína quinase de especificidade dupla, a qual, em retorno, fosforila ERK ("extracellular signal-regulated kinase"), outra quinase de serina/treonina (Downward, 1998). ERK pode fosforilar outras quinases, tais como Rsk2, e fatores de transcrição, tais como c-Fos, Elk1 e c-Myc (Garrington and Johnson, 1999).

Uma segunda via de sinalização importante envolve PI3K, uma quinase de lipídios que consiste de um heterodímero entre p85, a subunidade reguladora, e p110, a subunidade catalítica. PI3K é citoplasmática em células quiescentes mas é recrutada para o receptor de tirosina quinase ativado através do domínio SH2 de p85. PI3K pode ser diretamente ativada por Ras através da subunidade p110 (Rodriguez-Viciano et al, 1984). A ativação de PI3K protege a célula contra apoptose e é, conseqüentemente, considerada como um sinal de sobrevivência. Os lipídios fosfatidilinosítídeos produzidos por PI3K podem estimular várias quinases, incluindo Akt/PKB, uma quinase de serina-treonina cuja ativação é suficiente para proteger as células contra apoptose (Datta et al, 1999). Semelhante a Raf-1, Akt também é regulada através de localização e fosforilação.

A via da Proteína Quinase A (PKA)

Uma via de transdução de sinal importante, é a via ativada por proteínas G heterotriméricas. Proteínas G heterotriméricas são compostas de duas

unidades funcionais, uma subunidade α e uma subunidade $\beta\gamma$. Ambas subunidades, α e $\beta\gamma$, são liberadas do receptor após a ligação do ligante e podem ligar-se e ativar efetores específicos, diretamente. Para a subunidade α , um destes efetores é a proteína adenilato ciclase. Historicamente, subunidades α que estimulam adenilato ciclase são chamadas α_s (s, para "stimulatory"), enquanto aquelas que inibem adenilato ciclase são referidas como α_i (i, para "inhibitory"). Adenilato ciclase quando ativada, catalisa a hidrólise de ATP em AMP cíclico (cAMP). cAMP, ativa a enzima PKA (Proteína Quinase A ou Proteína Quinase dependente de cAMP). Esta enzima é composta por quatro subunidades, duas subunidades catalíticas e duas subunidades reguladoras, sendo que estas possuem sítios de ligação para cAMP. Quando cAMP liga-se às subunidades reguladoras de PKA, estas se dissociam das subunidades catalíticas que se tornam ativas. PKA regula uma série de processos celulares, entre eles, o metabolismo de glicogênio, através da fosforização da proteína glicogênio sintase, e transcrição gênica através da fosforilação de CREB (Proteína de Ligação a CRE). CREB é um fator de transcrição que reconhece elementos responsivos a cAMP (CRE) em promotores de vários genes, por exemplo, o de c-fos (Sassoni-Corsi et al, 1988).

Interação entre vias de transdução de sinal - vias ativadas por receptores tirosina quinase e vias ativadas por receptores acoplados a proteínas G

Proliferação celular é regulada por sinais extracelulares, incluindo fatores de crescimento e hormônios. Fatores de crescimento ativam receptores tirosina quinase, e podem estimular inúmeras cascatas de sinalização (Figura 1). Uma cascata, a de MAP quinase (ou ERK), dispara proliferação celular através de múltiplos mecanismos incluindo a indução

da estimulação da transição G1/S do ciclo celular e por ativar proteínas chaves na síntese de DNA e proteínas (Graves et al, 2000). Hormônios também podem ativar ERK1/ERK2 promovendo, deste modo, proliferação celular em muitos tipos de células (Dhanasekaran et al, 1995).

Talvez o melhor mecanismo de “cross-talk” entre proteínas G e a cascata das MAP quinases envolve a subunidade $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas. A ativação de ambos, receptores acoplados a G_i e G_q , libera $\beta\gamma$ para ativar a tirosina quinase c-Src, a qual pode ativar Ras via a fosforilação da molécula adaptadora Shc, a qual em retorno recruta um complexo consistindo de Grb2 e Sos para a membrana onde ela ativa Ras. Apesar das variações sobre o mecanismo utilizado, todos os exemplos de sinalização, da subunidade $\beta\gamma$ para ERKs, requer a ativação de Ras.

A subunidade α de G_s também foi implicada na ativação de MAPK. Por exemplo, mutantes constitutivamente ativados de $G\alpha_s$ são oncogênicos. $G\alpha_s$ dispara a síntese do segundo mensageiro c-AMP através da associação com adenilato ciclases específicas (Masters et al, 1988). O principal alvo de c-AMP é a proteína quinase dependente de c-AMP, PKA tem ações tipo-específicas sobre a sinalização de MAPK. Em muitos tipos celulares, PKA antagoniza a ativação de Raf-1 por Ras inibindo proliferação e transformação dependente de Ras (Seventson et al, 1993).

Figura 1. **Modelo simplificado das vias de sinalização desencadeadas pela presença de FGF-2 e ACTH**. A ligação de FGF-2 a seu receptor leva a ativação de Ras. Raf quinase e fosfoinositídeos 3 quinase ligam-se a uma região similar de Ras-GTP. A melhor via de sinalização entendida começa com a ativação induzida por Ras-GTP de Raf. Raf então fosforila e ativa Mek quinase, a qual então fosforila Erk quinase. Substratos para Erk incluem fatores de transcrição. Após a ligação de ACTH a seu receptor ocorre a ligação de proteínas G heterotriméricas a GTP e a liberação da subunidade α s, a qual promove a ativação de adenilato ciclase, aumentando a concentração de cAMP e conseqüente ativação de PKA. PKA tem vários alvos citoplasmáticos, entre eles Raf quinase, cuja atividade é inibida por PKA, e alvos

nucleares, por exemplo CREB (fator de transcrição responsivo a PKA), o qual ativa a transcrição de vários genes, entre eles c-fos.

Genes envolvidos no Controle da Progressão Celular

Quando uma célula quiescente passa de G0 para G1, a transcrição de vários genes é induzida. A primeira onda de transcrição é constituída por genes de resposta primária, e independe da síntese de proteínas. Parte dos produtos destes genes são fatores de transcrição (por exemplo, c-Fos e c-Myc), os quais são responsáveis por uma nova onda de transcrição gênica, desta vez, regulando a transcrição de genes conhecidos como genes de resposta secundária.

Entre os genes de resposta secundária, encontram-se as ciclinas. As ciclinas são importantes integradores de sinalização mitogênica, onde sua síntese é um ponto terminal da via Ras/Raf/MAPK (Malumbres and Pellicer, 1998). Elas são as subunidades reguladoras dos complexos Ciclinas/CDKs ("Cyclin Dependent Kinase"), quando estes complexos são formados, as CDKs fosforilam substratos como pRb liberando o fator de transcrição E2F (Morgan, 1997; Sher, 2000), que por sua vez controla a expressão de outros genes relacionados com a progressão do ciclo celular, por exemplo ciclina E (Malumbres and Barbacid, 2001).

Outros genes importantes no controle do ciclo celular são os inibidores dos complexos Ciclina/CDK: CIP ("Cyclin Inhibitor Protein"), INKs ("Inhibitors of Kinase") e KIPs ("Kinase Inhibitor Protein"). Estas proteínas ligam-se aos complexos de Ciclina/CDK inibindo a atividade de quinase de CDK e, portanto, bloqueando a progressão do ciclo celular. Entre estes inibidores estão p16^{INK}, p27^{KIP} e p21^{CIP} (Hall and Peters, 1995).

Diferentemente das CDKs, que possuem expressão constitutiva ao longo de todo o ciclo celular, as ciclinas e os inibidores têm expressão

regulada em diferentes fases do ciclo celular através de controle transcripcional e/ou traducional associado ou não a processos de ubiquitinação proteolíticos de regulação dose-tempo dependente. Assim, a progressão ao longo do ciclo celular em eucariotos, promovida por fatores mitogênicos extracelulares, depende da máxima expressão antagônica de ciclinas e seus inibidores, que se alternam na regulação da atividade das CDKs.

O gene c-myc

c-Myc é o mais ubiqüo e melhor estudado membro de uma família de proteínas que inclui N-Myc, L-Myc, S-Myc and B-Myc. O N-terminal das proteínas Myc contém o domínio de ativação transcripcional, dentro do qual existem dois segmentos de 20 aminoácidos chamados Box 1 e 2, os quais encontram-se conservados entre a maioria dos membros da família de proteínas Myc e parece, na maioria dos casos, ser crucial para todas as atividades biológicas. O C-terminal de Myc inclui o motivo básico/hélice-loop-hélice/leucina zíper (b/HLH/Z) que media a oligomerização com a proteína b/HLH/Z Max e o reconhecimento da sequência E-box em promotores das seqüências alvos. A proteína Max também age como um parceiro heterodimérico para a família de proteínas b/HLH/Z Mad, que agem como repressores transcripcional sobre a mesma sequência E-box, o que pode antagonizar a função de Myc (Foley and Eisenman, 1999). Enquanto Max é ubiqüa e constitutivamente expressa, a expressão de Myc e Mad é finamente regulada em relação ao crescimento celular; os níveis de Myc são altos em células ciclando mas diminuem quando as células param de proliferar, a expressão de Mad segue o padrão oposto. Deste modo, a precisa regulação dos níveis de expressão de Myc e Mad é crítica para determinar a formação dos heterodímeros Myc/Max ou Mad/Max e,

conseqüentemente, crescimento ou inibição celular, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. **Representação esquemática da rede Myc-Mad-Max (baseado em Amati, 2001).** Myc forma heterodímeros obrigatórios com Max, e liga-se a seqüência consenso CA(C/T)GTG (E-box). Dimerização com Max e ligação ao DNA são essenciais para função de Myc. Max também dimeriza com a família de proteínas Mad/Mxi. Estes dímeros ligam-se a mesma seqüência consenso que Myc/Max, mas ao contrário que estes agem como repressores transcripcional.

Uma variedade de estudos demonstrou que uma fina regulação dos níveis da proteína Myc é essencial para uma função celular normal. Enquanto deleção homozigota do gene myc resulta em morte do embrião (Charron et al, 1992), superexpressão constitutiva de Myc em células em cultura, bem como em animais transgênicos, bloqueia diferenciação, induz transformação e pode iniciar apoptose (Coppola and Cole, 1986). Além disso, uma extensa variedade de tumores de ocorrência natural exhibe translocação cromossômica e amplificação do locus de c-myc o que resulta em superexpressão constitutiva da

proteína Myc (Cole, 1986; Spencer and Groudine, 1991). Talvez uma das melhores evidências que demonstram o importante papel que as flutuações dos níveis da proteína Myc têm sobre a função de Myc vem de estudos em camundongos carregando transgenes de myc induzíveis. Foi observado que a expressão aumentada de c-Myc em linhagens da pele ou hematopoiética, em camundongos transgênicos, leva a fenótipos pré-malignos ou malignos, respectivamente; porém, quando a expressão de Myc é desligada nestes sistemas, ocorre repressão espontânea das mudanças neoplásicas e malignas (Felsher and Bishop, 1999).

Numerosos estudos têm documentado que o acúmulo regulado por crescimento do mRNA de myc (Kelly et al, 1983; Luscher and Eisenman, 1990) resulta de um aumento na transcrição e também do aumento na estabilidade de myc (Jones and Cole, 1987; Luscher and Eisenman, 1990). Foi mostrado recentemente que o controle pós-traducional dos níveis de proteína Myc também contribui para o acúmulo de Myc. A proteína Myc exibe uma meia vida extremamente curta, aproximadamente 30 minutos em células crescendo (Hann and Eisenman, 1984), devido a sua destruição através da via ubiquitinina/26S proteossoma (Ciechanover, 1991). Além disso, o "turnover" de Myc pelo sistema ubiquitinina/proteossoma parece ser regulado. A meia-vida de Myc diminui durante o processo de diferenciação celular (Spotts and Hann, 1990), e aumenta após estímulo para crescimento celular (Sears et al, 1999). Assim, o aumento na proteína Myc, normalmente observado após estímulo para crescimento, quando as células entram na fase G1 do ciclo celular reflete tanto um aumento na síntese de mRNA como um concomitante aumento da estabilização da proteína mediada por Ras (Figura 3).

A estabilidade da proteína Myc é regulada pela fosforilação, na porção N-terminal, dos resíduos de Thr 58 e Ser 62, os quais exibem papéis

opostos no controle da estabilidade da proteína Myc. Assim, a fosforilação de Ser 62 está envolvida na estabilização de Myc, enquanto que fosforilação de Thr 58, a qual é dependente da prévia fosforilação de Ser 62, promove a degradação de Myc através da via ubiquitinina/proteossoma. Além disso, o controle da fosforilação destes resíduos é regulado por mitógenos e depende das vias de Raf/ERK e PI3-K/Akt, ativadas por Ras (Sears and Nevins, 2002).

Figura 3. **Modelo simplificado de sinais que modulam a expressão de Myc, e suas conseqüências sobre crescimento e proliferação.**

A transcrição de c-myc é rapidamente induzida por uma variedade de fatores de crescimento e estímulos mitogênicos. O aumento nos níveis da proteína Myc observado quando as células entram na fase G1 reflete tanto um aumento na síntese de mRNA como também um aumento na estabilização da proteína devido a fosforilação induzida por Ras através das vias de ERK e PI3-K.

O gene c-fos

Como dito anteriormente, a proteína Ras ativada estimula uma cascata de quinases citoplasmáticas, incluindo as que compõem as MAPKs, o que em retorno culmina na fosforilação de fatores de transcrição nucleares resultando na ativação transcripcional de genes que mediam crescimento (de Vries-Smits et al, 1992).

A indução da transcrição de c-fos e c-jun é uma das primeiras respostas nucleares a uma extensa variedade de estímulos e acredita-se ser crucial na mediação de proliferação celular. As famílias jun e fos de genes são compostas de três membros para jun (c-jun, junB e junD) (Ryder and Nathans, 1988) e quatro membros para fos (c-fos, fosB, fra1 e fra2) (Cohen, 1988). Estes genes codificam componentes do fator de transcrição AP1 (Proteína Ativadora 1), formado por homo ou heterodímeros das proteínas Jun e Fos. Como as proteínas Fos não formam dímeros entre si, AP1 é composto ou pelos dímeros de baixa afinidade Jun/Jun ou por dímeros de alta afinidade Jun/Fos (Mechta et al, 1997). Entre os membros da família fos, o gene c-fos tem sido muito utilizado como marcador de proliferação celular em resposta a potenciais agentes mitogênicos, pois, após a exposição a um estímulo, tanto o mRNA como a proteína c-Fos são rápida e abundantemente induzidos, e está presente em quase todos os tecidos até então investigados.

Y-1, um Modelo para Estudos sobre ACTH

A Linhagem Celular Y-1

As células Y-1 têm sido amplamente utilizadas por nosso laboratório para estudar os mecanismos reguladores ativados por ACTH no controle do crescimento celular, com ênfase na transição G0 → G1 → S (Armelin et al, 1996, Lotfi et al, 2000). A linhagem celular Y-1 é responsiva ao

hormônio ACTH, secreta esteróides, sendo, portanto, um modelo bastante útil para o estudo da regulação da função da adrenal. Estas células são tumorigênicas e sabidamente possuem o gene c-K-ras amplificado (Schwab et al, 1983, George et al, 1984) e cuja superexpressão parece necessária para manter o estado maligno destas células (Kimura and Armelin, 1988).

Provavelmente, a superexpressão de K-ras leva a alguma alteração na transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ do ciclo celular de Y-1. O grau desta alteração, parece pequeno e é evidenciado por dois indicadores: a) o índice de marcação de núcleos por BrdU em células carenciadas - após carenciamento de soro por 48 horas, o ciclo celular de Y-1 não é totalmente bloqueado na interface $G0/G1$, restando um basal de entrada em S, após a incorporação de BrdU por 12 horas (Armelin et al, 1996); b) basal de myc, mensageiro e proteína - células Y-1, após carenciamento de 48 horas, apresentam um basal do mRNA de c-myc e também da proteína. (Armelin et al, 1996; Lepique et al, 2000).

Por outro lado apesar desta pequena alteração, o que se mostra enigmático em Y-1 é a verificação de que, apesar desta célula apresentar níveis constitutivos de Ras-GTP- o qual varia de 8 - 15% - (K. Rocha and Armelin, dados não publicados), a via de Raf-1/MEK/ERK encontra-se finamente regulada, sendo robustamente ativada quando do estímulo de Y-1 com FGF-2. Contudo, Akt, um dos alvos de PI3K (a qual sabidamente é um dos efetores de Ras-GTP), encontra-se constitutivamente ativada (Forti et al, 2002), sendo que, foi verificado por Forti, utilizando o subclone Ras 3.1, que estes níveis constitutivos de ativação são dependentes de K-Ras-GTP.

Uma importante diferença entre os efeitos de FGF-2 e ACTH referem-se à expressão do gene c-myc. FGF-2 promove a expressão do gene c-myc estimulando tanto a transcrição gênica como também estabilizando a proteína c-Myc. ACTH, por outro lado, tem efeitos opostos, fortemente

desestabilizando a proteína c-Myc, sem interferir com a transcrição do gene (Lepique et al, 2000). Portanto, a proteína c-Myc, certamente, é uma candidata central como o principal alvo molecular dos efeitos antagônicos de FGF-2 e ACTH, respectivamente, mitogênico e antimitogênico.

O Hormônio ACTH

O hormônio ACTH reconhece na membrana celular um receptor específico do tipo sete hélices transmembranares, sendo este receptor ligado à proteína G. Em Y-1, certamente há expressão de Gs, uma vez que a via de adenilato ciclase é ativada por ACTH, mas não há dados em relação a outros tipos de proteínas G. Neste momento existe uma intensa expectativa sobre o progresso do conhecimento dos mecanismos de transdução iniciados nos receptores de ACTH. A linhagem clonal Y-1 de células adrenocorticais funcionais de camundongo (Yasumura et al, 1966) tem sido o único modelo experimental de cultura permanente disponível para o estudo dos mecanismos de ação de ACTH na adrenocórtex.

Em relação ao controle da proliferação celular, ACTH tem um forte efeito anti-mitogênico, o que aparece claramente quando somente uma parcela das células estimuladas por FGF-2 entra na fase S do ciclo celular. Células em crescimento exponencial, tratadas com ACTH, também sofrem bloqueio do ciclo celular na fase G1.

ACTH é um clássico hormônio peptídico da hipófise que regula estereoidogênese e crescimento do córtex adrenal. Investigações sobre os mecanismos moleculares pelos quais ACTH dispara a resposta de estereoidogênese progrediram enormemente nos últimos anos. Por outro lado, apesar dos estudos sobre o mecanismo de ação de ACTH sobre o crescimento celular estarem crescendo, muitas coisas

permanecem sem esclarecimento. Anos atrás, ACTH, foi visto como um hormônio de efeitos difíceis de serem entendidos sobre o crescimento, parecendo ser mitogênico no organismo intacto, mas anti-mitogênico em linhagens celulares e cultura primária de camundongo, rato, vaca e células adrenocortinais de humanos. Atualmente, estes efeitos aparentemente contraditórios de ACTH sobre crescimento, não mais causam surpresa. Algumas moléculas sinalizadoras são conhecidas, por, dependendo do contexto celular, levarem a crescimento, diferenciação terminal ou apoptose.

A proteína dominante negativa RasN17

Sabe-se que proteínas mutantes inibitórias funcionam competindo com as espécies proteicas selvagens correspondentes, rompendo interações intermoleculares críticas, tendo o potencial de gerar informações sobre a atividade geral do produto do gene alvo, e também sobre outras moléculas requeridas em sua atividade.

Um dos mutantes que vêm sendo utilizado para estudos sobre a ação do gene ras é o mutante dominante negativo H-ras Asn-17 (Feig et al, 1988), o qual apresenta a serina presente na posição 17, substituída por asparagina. Este mutante foi isolado como um mutante de H-ras, cuja proteína produto possuía uma afinidade preferencial por GDP, sugerindo que a proteína mutante falharia em ligar-se a alvos abaixo por não se ligar a GTP. Porém, experimentos subseqüentes têm mostrado que este não é o caso: a alteração na afinidade é insuficiente para evitar que RasN17 ligue-se a GTP *in vivo*, e este mutante mesmo quando ligado a GTP não consegue ligar-se a proteínas abaixo de Ras. Estes achados sugerem que a proteína H-Ras Asn-17 (RasN17) compete com p21-Ras normal por um sítio celular comum e que a proporção de expressão entre as duas proteínas (mutante e endógena) determina as

propriedades de crescimento da célula. Nas células, a proteína mutante RasN17 liga-se mais fortemente a GEF que a proteína Ras normal, isto ocorre por duas razões. RasN17 apresenta uma afinidade reduzida para nucleotídeos, deste modo a probabilidade de GEF ser substituída por um nucleotídeo guanina, neste mutante, é muito menor. Segundo, a forma livre de nucleotídeo, neste mutante, tem uma afinidade por GEF maior que a proteína Ras selvagem (Feig, 1999) (figura 4). Para explicar porque isto ocorre requer uma breve explicação de como GEF promove a troca de nucleotídeos. Ras-GDP liga-se a GEF com uma afinidade relativamente baixa ($> 10\mu\text{M}$). Esta ligação promove a liberação de GDP ligado, levando a formação de um complexo binário transiente entre Ras livre de nucleotídeos e GEF. Este complexo deveria ser muito estável exceto o fato que nucleotídeos, tem uma afinidade muito maior por Ras livre de nucleotídeos ($K_a 10^{11} \text{ M}$). Como GTP está em concentrações maiores que GDP, GTP rapidamente liga-se a Ras e substitui GEF.

Neste trabalho usaremos um vetor cuja seqüência para a proteína dominante negativa está sob o controle do promotor MMTV-LTR ("Mouse Mammary Tumor Vírus Long Terminal Repeat"). O promotor MMTV-LTR pode ser ativado por glucocorticóides através da interação do complexo hormônio/receptor com HREs (Elementos Responsivos a Hormônios).

A superfamília de receptores para hormônios esteróide/tiróide (por exemplo, glucocorticóide, vitamina D, ácido retinóico e tiroxina) é uma classe de proteínas que reside dentro do citoplasma e liga-se a hormônios lipofílicos. Estes hormônios são capazes de penetrar livremente a membrana plasmática hidrofóbica. Após ligação do ligante, o complexo hormônio-receptor transloca-se para o núcleo e liga-se a seqüências específicas no DNA, chamadas elementos de resposta a hormônio (HREs). A ligação do complexo a uma HRE resulta em velocidade de transcrição alterada do gene associado.

Figura 4. **Como o dominante negativo RasN17 previne a ativação de Ras nas células.** a) o ciclo de ativação de Ras . Fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs) ativam Ras por promover a troca de GDP por GTP em Ras. b) a expressão do dominante negativo RasN17 nas células previne a ativação de Ras endógeno por ligar-se mais firmemente a GEFs específicas para Ras que a proteína Ras normal. Como a proteína RasN17 não pode ligar-se a alvos abaixo dela mesmo quando ligada a GTP, a formação de Ras funcional, ligada a GTP, nas células é evitada.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho são: primeiro, verificar se a superexpressão de p21 K-ras em Y-1 é, de fato, responsável pela regulação atenuada da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ e pelo nível basal de Myc; segundo, examinar se p21 ras é importante na transdução do sinal mitogênico de ACTH. A abordagem experimental consistirá no estudo dos efeitos do bloqueio parcial da atividade de p21 K-Ras através do mutante dominante negativo H-Ras Asn-17 a ser transfectado em Y-1, sob o controle de um promotor induzível.

Plano Experimental

Transfectar células Y-1 com vetores contendo o cDNA para a expressão da proteína dominante negativa de H-Ras (Asn-27 p21 ras);

Verificar se o bloqueio ou redução parcial da atividade de p21 K-Ras recupera o controle restrito da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ e a fina regulação de Myc;

Examinar se o bloqueio ou redução parcial da atividade de p21 Ras interfere na ativação de ERK/MAPK, na indução de c-Fos e na estimulação da entrada na fase S das células Y-1

Materiais e Métodos

Materiais

A linhagem celular Y-1

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

A linhagem celular Y13-259

A linhagem celular Y13-259 produz um anticorpo monoclonal de rato o qual especificamente reconhece a proteína p21 Ras. Esta linhagem celular é da ATCC (catálogo CRL 1742) e nos foi gentilmente cedida pelo Dr. Kaplan.

Plasmídeos

pMMrasDN - contém a seqüência para RasN17. Esta seqüência está sob o controle do promotor MMTV LTR o qual é induzido por glucocorticóides, por exemplo dexametasona. Este vetor nos foi gentilmente cedido pelo Dr. Armando Ventura.

pCAGrasDN – contém a seqüência para RasN17 sob o controle do promotor para β -actina. Este vetor nos foi gentilmente cedido pelo Dr. Larry Feig.

pMM Δ ras (vetor vazio) – este vetor foi obtido a partir da digestão do vetor pMMrasDN com as enzimas de restrição BamHI e HindIII para a retirada da seqüência codificadora para a proteína ha-ras Asn17 (RasN17). Foi utilizado para transfectar células Y-1, as quais foram usadas como células controle.

pTRErasDN – resultou da subclonagem do cDNA para o dominante negativo H-ras Asn-17 no vetor de expressão de mamíferos pTRE. Este vetor, mais os vetores pTet-ON e pTkhygro, foram gentilmente cedidos pela Dra. Mari Sogayar.

pTet-ON – contém a seqüência reguladora do promotor do vetor pTRE.

pTkhygro – contém marca de resistência para higromicina, será co-transfectado com o vetor pTRErasDN.

pSV2neo – contém marca de resistência para geneticina, será co-transfectado com pMMrasDN.

pLS – vetor contendo o cDNA de 1,47 Kb de c-myc, clonado a partir de células J558 plasmocitoma de camundongo (cedido pelo Dr. Kenneth Marcu).

pGAPDH – pBluescript SK⁺ contendo o fragmento de 325 bp do cDNA de GAPDH de camundongo (construção realizada em nosso laboratório).

pGEX-2T-RDB – codifica o domínio de ligação de c-Raf a Ras fundido a GST (Glutathione S Transferase). Este vetor foi cedido pelo Dr. Alfred Wittinghofer (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie).

Anticorpos

Anti pan-ras monoclonal Y13-259

Anti-IgG de rato feito em coelho - Sigma

Anti Ha-ras policlonal - Santa Cruz Biotechnology

Anti c-Myc policlonal - Santa Cruz Biotechnology

Anti c-Fos policlonal - Santa Cruz

Anti ERK 1,2 total - New England Biolabs

Anti ERK 1,2 fosforilada - New England Biolabs

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

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

Anti-bromodeoxiuridina monoclonal - Amersham Pharmacia

Hormônios, Fatores de Crescimento e Outros Peptídeos

ACTH 1-39 Sigma – solução estoque 10^{-6} M

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

Inibidores de Fosfatase ou Protease

Ortovanadato de sódio – solução estoque 100mM em água bidestilada

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

Pepstatina – solução estoque 1mg/ml em etanol absoluto

PMSF – solução estoque 1mg/ml em isopropanol

DTT – solução estoque 1M

Ortovanadato – solução estoque 100mM

Leupeptina - solução estoque 250 μ M

KITS

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

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

ECL Western blotting (Amersham Pharmacia) - Western blot

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

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

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

Drogas e Antibióticos

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

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

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

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

Dexametasona (Sigma) – solução estoque 1mM em etanol

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

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

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

Soro e meio de cultura

DMEM - Dullbeco's Modified Eagle Medim (Sigma)

FCS - Fetal Calf Serum (Cultilab)

Soluções

LB - Luria Bertani Medium - (Tryptona 10g/l, extrato de levedura 5g/l, NaCl 10g/l pH 7,5)

2YT - 16g de triptona, 10g de extrato de levedura, 5g NaCl, pH 7,0

SOB – 20g de bacto triptona, 5g de extrato de levedura, 10ml NaCl 1M, 5ml KCl 0,5M, 10ml MgCl₂ 1M, 10ml MgSO₄ 1M, pH 7,0

SOC – SOB mais 20mM glicose

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

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

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

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

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

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

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

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

Solução desnaturante I de DNA - 0,15M HCl

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

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

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

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

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

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

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

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

Tampão RIPA – 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 0,5% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 0,1% SDS

IPTG – solução estoque 1M

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

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

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

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

Isótopos radioativos

^{32}P α -dCTP

Enzimas

AccI (Gibco)

Bam HI (Gibco)

Eco RI (Gibco)

HindIII (Gibco)

KpnI (Gibco)

NcoI (Gibco)

PstI (Gibco)

PvuII (Gibco)

SalI (Gibco)

Large T fragment DNA polimerase (Gibco)

Thermo Sequenase II DNA polimerase (Amersham/Pharmacia)

Oligonucleotídeos

5' GTG CCT GTT GGA CAT CCT GG 3' ("downstream primer")

5' AGG GTT CAG CTT CCG CAG C 3' ("upstream primer")

Métodos

Cultura Celular

As células Y-1 e os subclones (derivados de Y-1 e transfectados com o vetor pMMrasDN) foram mantidos em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FCS) e antibióticos. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio é feita a cada 4 dias e, no caso de subcultivo, o meio é aspirado, as células são lavadas com PBSA e tripsinizadas. Quando estiverem soltas são ressuspensas em DMEM com soro e a suspensão é distribuída em várias placas ou garrafas.

Para o carenciamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e uma vez com meio de cultura DMEM sem adição de FCS para eliminar qualquer traço de soro, adiciona-se, então, DMEM sem soro fetal bovino. A adição de hormônios ou fatores de crescimento utilizados nos experimentos é feita após 48h de carenciamento. Para a indução da proteína dominante negativa, dexametasona é adicionada ao meio de cultura 24 horas antes do término do carenciamento.

Estoques de células Y-1 e dos subclones RasN17 derivados de Y-1 foram mantidos em DMEM contendo 10% de soro e 10% de DMSO e congelados em nitrogênio líquido.

Análise de Entrada em S por Incorporação de BrdU

Lamínulas circulares contidas em placas de 100mm de diâmetro foram plaqueadas com células de modo a obter-se uma densidade de aproximadamente $1,5 \cdot 10^4$ células por lamínula e mantidas em DMEM com 10% FCS. Após vinte e quatro horas as placas foram lavadas duas vezes com PBS e uma vez com DMEM sem FCS e as lamínulas foram

transferidas para uma nova placa contendo DMEM sem FCS. Mantiveram-se as células durante 48 horas em meio sem soro e após este período adicionou-se BrdU (100 μ M/ml).

Em experimentos onde se procurava determinar o tamanho de G1, trinta minutos após a adição de BrdU acrescentou-se ao meio o fator de crescimento de interesse. Duas lamínulas foram retiradas a cada duas horas, durante catorze horas. As lamínulas retiradas foram lavadas uma vez com PBS e fixadas durante 10 minutos em metanol gelado. Após este procedimento foram feitas três lavagens com PBS e adicionou-se 2ml de HCl 1,5M, mantendo-se as lamínulas por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação constante. A seguir lavou-se as lamínulas três vezes com PBS e incubou-se 30 minutos com anticorpo anti-BrdU a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS por cinco minutos sob agitação e a seguir incubadas com anticorpo IgG-FITC por trinta minutos sob agitação ao abrigo da luz. Fez-se nova lavagem como descrito anteriormente, mantendo-se as lamínulas no escuro. Incubou-se com DAPI (5 μ g/ml) por 20 minutos. Após lavagem com PBS as lamínulas foram montadas e mantidas em geladeira, no escuro, até serem analisadas em microscópio de fluorescência Nikon Pluophot utilizando-se filtros de excitação UV 330-380nm e UV 420-490nm (para visualizar núcleos marcados com BrdU/fluoresceína e DAPI, respectivamente).

Por outro lado, quando se queria simplesmente determinar a porcentagem de células que entraram na fase S do ciclo celular, as células foram estimuladas com o agente de interesse, e, após um período de 8 a 12 horas adicionou-se BrdU. Após 24 horas após o estímulo, as células foram fixadas, seguindo-se a partir daí, o mesmo protocolo descrito anteriormente

Obtenção do anticorpo monoclonal anti-ras Y13-259

As células Y13-259 foram plaqueadas em garrafas de 150 cm² em 10% FCS. Quando as células atingiram uma confluência de 75 – 80% o meio foi retirado e centrifugado para a coleta das células que estavam em suspensão. As células aderidas à garrafa foram tripsinizadas e unidas às células que foram centrifugadas, sendo colocadas em novas garrafas. Nesta fase (confluência em torno de 80%), o meio com soro foi retirado e adicionou-se meio sem soro, deixando por um período de 24 – 36 horas.

Este meio (meio condicionado) foi coletado, centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm para remover as células em suspensão e o sobrenadante foi resfriado em gelo. Adicionou-se sulfato de amônia (sólido) para o equivalente a 50% de saturação (314 g/l). Incubou-se em gelo por 20 minutos agitando-se lentamente, algumas vezes. Após este período centrifugou-se por 15 minutos a 10 krpm e ressuspendeu-se o precipitado em PBS (volume suficiente para concentrar a amostra 20 vezes). Dialisou-se contra PBS durante 24 horas, realizando-se três trocas durante este intervalo. A amostra foi analisada por SDS-PAGE para verificar concentração e pureza da preparação.

Figura 5. **Anti p21 ras preparado a partir de meio condicionado de células Y13-259.** O anticorpo monoclonal para Ras foi obtido como descrito acima.

Preparação de GST-RDB

Após transformação da bactéria BL21 com o plasmídeo pGEX-2T-RDB, inoculou-se uma colônia em meio 2YT contendo 100µg/ml de ampicilina e manteve-se a 37° C, durante a noite. 3ml desta pré-cultura foi inoculada em 500ml de 2YT contendo 2% de glicose e 100µg/ml de ampicilina. Deixou-se crescer a 37°C até alcançar a $OD_{600} = 0,6 - 0,8$. Neste ponto adicionou-se 1mM de IPTG e incubou-se por mais duas horas. A suspensão de bactérias foi centrifugada por 10 minutos a 8krpm a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 10ml PBS contendo 0,5-2mM DTT, 0,1µM aprotinina, 1µM de leupeptina, 1µM pepstatina e 1mM PMSF. As bactérias foram sonicadas em gelo por 10 ciclos (microtip, 60W), procedimento este que se repetiu por 6 vezes. Após a adição de Triton X-100 na concentração final de 1%, misturou-se lentamente por 30 minutos a 4°C, centrifugou-se a 3krpm por 10 minutos e adicionou-se glicerol na concentração final de 10%. Os lisados contendo GST-RBD foram aliquotados e guardados a -80°C. Antes e

após a indução com IPTG, retirou-se uma alíquota de 500µl, centrifugou-se e ressuspendeu-se em 100µl de 1X tampão de amostra de SDS e foram utilizados 20µl para análise em 15% SDS-PAGE.

Figura 6. **Expressão e purificação de GST-RBD.** Gel de poliacrilamida-SDS da expressão e purificação de GST-RBD. Lane 1 Peso Molecular. Lanes 2, 3 e 4 são o extrato total de uma linhagem bacteriana expressando a proteína de fusão glutathione S-transferase-RBD sem (2) e com (3 e 4) a indução de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo (IPTG). Lanes 5 a 8 mostram os diferentes estágios da preparação de GST-RBD: 5 e 6- precipitado e sobrenadante (respectivamente), após sonificar e centrifugação extrato celular, 7 e 8- diferentes concentrações de GST-RBD após ligação aos "beads" de glutathione sefarose.

Extração de Proteína Total

As células foram plaqueadas em placas de 100mm de diâmetro e ao atingirem confluência de aproximadamente 70% foram lavadas duas vezes com PBS e carenciadas por 48 horas. O promotor sob o qual a expressão de RasN17 no vetor pMMrasDN é induzível por glucocorticóides, assim, onde indicado, as células foram tratadas com 0,5 µM de dexametasona, até 24 horas antes do estímulo. Após este

período (48 horas de carenciamento) as células foram estimuladas. Seguiu-se a este procedimento a lavagem das células duas vezes com PBS gelado e a adição de tampão de lise (RIPA) contendo inibidores de protease. Após incubação em câmara fria por 10 minutos, sob agitação, as células foram raspadas com um policial e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. A seguir, o sobrenadante foi aliquotado em eppendorfs e estocado a - 80°C. Uma alíquota de 20 µl é separada para dosagem de proteínas. A dosagem de proteína total é feita utilizando-se o reagente de Bradford (BioRad).

Precipitação de Ras-GTP

O lisado de GST-RBD foi incubado com "beads" de glutathione-agarose por 30 minutos à temperatura ambiente e após centrifugação (500 rpm, 2 minutos) lavou-se três vezes com RIPA. A seguir, fez-se incubação de 80µg da proteína de fusão imobilizada com 300µg de proteína total do lisado de células Y-1 preparado com o tampão RIPA (descrito anteriormente) por 1 hora a 4°C. Fez-se nova centrifugação e lavagem com tampão RIPA e ressuspendeu-se os "beads" em tampão de amostra de proteínas. As proteínas foram fracionadas em 15% SDS-PAGE.

SDS-PAGE

Tomam-se 100µg de proteína total e adiciona-se 1X (V/V) tampão de amostra para proteína 4X. A seguir ferve-se as proteínas por 5 minutos. As proteínas são resolvidas em gel de poliacrilamida a 35-50 mA durante a noite.

Western-Blot

As amostras de proteínas foram separadas em gel de SDS-PAGE e subsequentemente fez-se a transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond-C) aplicando-se 23V, 500mA e 50W por 1 hora em cuba de transferência "semi-dry" (BioRad). A membrana foi bloqueada com 5% leite desnatado em TBST por 2 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se a este procedimento a incubação com o anticorpo monoclonal de rato Y13-259 (10µg/ml), o qual reconhece todas as formas de Ras, em TBST contendo 4% leite desnatado (16 horas a 4°C). A membrana foi lavada 3 vezes por 10 minutos com TBST e incubada com o anti-IgG de rato feito em coelho (1:2000) em TBST contendo 2,5% de leite por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, lavou-se a membrana 3 vezes por dez minutos com TBST e incubou-se com o anti-IgG de coelho conjugado com HRP (1:1000) em TBST por 1 hora. Após três lavagens fez-se a detecção com o Kit ECL (Enhanced Chemiluminescence). Para a proteína H-Ras, bloqueou-se a membrana por uma hora com 5% leite desnatado em TBST, e, após as lavagens incubou-se 1 hora com o anticorpo monoclonal anti H-Ras. Seguindo-se a incubação com o anti-IgG de coelho conjugado com HRP. Quando da utilização do anticorpo para k-Ras, o anticorpo primário foi incubado "overnight" em 5% de leite, seguindo-se após este período a incubação com o anti-IgG de camundongo conjugado com HRP. Em cada etapa deste procedimento realizavam-se as lavagens já descritas anteriormente. Para detecção da proteína utilizou-se o Kit ECL, de acordo com as recomendações do fabricante.

O kit **ECL** (Enhanced Chemiluminescence) tem como princípio da reação de quimioluminescência a oxidação do luminol, catalisada por HRP/H₂O₂ em meio alcalino. Após a oxidação, o luminol encontra-se no estado excitado e decai para o estado fundamental por uma via de emissão de luz. A amplificação do sinal é feita pela reação de oxidação do luminol em presença de amplificadores, como, por exemplo, fenóis, resultando

em um aumento de cerca de 1000 vezes na emissão de luz. O tempo de exposição dos filmes varia de 5s a 2 min. Dependendo do anticorpo primário utilizado, faz-se diluições maiores ou menores e o tempo de exposição é variável, de modo a resultar em um melhor sinal.

Ensaio de Imunocitoquímica

A reação de imunocitoquímica é uma reação enzimática de peroxidase. Utiliza-se para esse tipo de reação um anticorpo primário, seguido de um anticorpo secundário biotinilado e de um complexo avidina/HRP-biotina. O sistema avidina/biotina é amplamente utilizado porque avidina tem quatro sítios de ligação a biotina, e a maioria das proteínas pode ser conjugada com biotina.

Aproximadamente, 15 mil células foram plaqueadas em lamínulas de 1cm de diâmetro. As células foram lavadas com PBS e fixadas com 3,7% de formaldeído por 30 minutos a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBSA as células foram tratadas com 1% de NP-40 por 20 minutos para permeabilizar, a este passo seguiu-se a incubação por 1 hora a temperatura ambiente, em 0,3% Triton X-100 e 5% soro normalizador em PBSA, para reduzir a ligação inespecífica de anticorpos. As células foram lavadas 3 vezes com PBSA por 10 minutos cada, repetiu-se este procedimento em cada uma das etapas seguintes. As células foram tratadas com uma mistura de um anticorpo primário e albumina sérica (1mg/ml) em 0,3% Triton X-100, durante a noite a 4°C. A proteína foi evidenciada utilizando-se o Kit Vectastain ABC e DAB, segundo as recomendações do fabricante. Após lavagem (3X de 10 minutos), incubam-se as lamínulas com anticorpo secundário diluído 1:200 em solução de Triton X-100 0,3% em PBSA, 15µl/ml de soro bovino, por 1h e foram feitas novas lavagens. As células foram incubadas com o complexo avidina/biotina por 1h e novamente lavadas

com PBSA. A reação enzimática foi feita utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como substrato, o que cora os núcleos marcados em marrom. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e contra-coradas com hematoxilina/carbonato de lítio. Os núcleos não marcados coram-se em azul. As células foram contadas (500 células/lamínula) em microscópio Nikon.

Extração de RNA total e Northern Blot

O RNA total foi purificado a partir de placas de 100 mm. As células foram lavadas três vezes com PBS e então lisadas com 2,0 ml de Trizol (Gibco). O RNA foi obtido de acordo com o protocolo do fabricante (Gibco/BRL). Após quantificação 10 µg de RNA foi ressuspendido em tampão de amostra para RNA e desnaturado a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de agarose 1% desnaturante (3,7% formaldeído e 1X MOPS) a 5V por cm de gel. O gel é lavado com água destilada, no mínimo, 3 vezes por 20 minutos e com SSC 15X 1 vez por 20 minutos, e transferido para membrana de nitrocelulose (Hybond-N, Amersham Pharmacia) por capilaridade durante a noite em 15X SSC. A membrana foi aquecida a 80°C por 2h e hibridizada com a sonda de interesse. Faz-se em paralelo uma hibridização com uma sonda de GAPDH de camundongo, a qual funciona como um controle interno

Marcação de Sonda Radioativa

O cDNA de c-myc (1,47Kb), H-ras (1,0 kb) e GAPDH (1,3 kb) foram utilizados como sonda nos experimentos de Northern blot. A seqüência foi marcada com ³²P α-dCTP por reação de "Random primer extension", utilizando-se a enzima Large T Fragment. 25 ng de cDNA foram fervidos

juntamente com 100 μ M de Random primers por 5 minutos para desnaturação das fitas e, a seguir, resfriados em gelo. Adicionaram-se 100 μ M de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP), 2 μ l de "Large T Fragment" e 50 μ Ci de α^{32} P dCTP. Incubou-se a reação por 2,5h a 25°C e a seguir a sonda foi purificada em coluna G50 Sephadex, para separação dos nucleotídeos livres.

Hibridização

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de pré-hibridização por 3h a 42°C e a seguir incubadas com a sonda marcada a 42°C durante a noite em solução de hibridização. A membrana é lavada 2 vezes com solução 1% SSC/0,1%SDS e uma vez com solução 0,1%SSC/0,1%SDS à temperatura ambiente. A última lavagem é feita com solução 0,1%SSC/0,1%SDS a 56°C. A membrana é embrulhada em filme plástico e exposta ao filme de raios-X por, pelo menos, 24 horas.

Sistema de Expressão Tet-On (Clontech)

Em *E. coli*, a proteína repressora Tet (TetR) regula negativamente os genes do operon de resistência a tetraciclina. TetR bloqueia a transcrição destes genes por ligar-se às seqüências no operador (tetO) na ausência de tetraciclina (Tc). TetR e tetO provide a base de Tet-On para uso em sistemas experimental em mamíferos.

O primeiro elemento crítico do Sistema Tet é a proteína reguladora, baseada em TetR. No sistema Tet-On a proteína reguladora é baseada em um "reverso" de TetR (rTetR) a qual foi criada pela mudança de quatro aminoácidos em TetR (Hillen and Berens, 1994; Gossen, 1995). A proteína resultante, rtTA, é codificada pelo plasmídeo regulador pTet-

On, o qual também contém o gene de resistência a neomicina para permitir a seleção de células estavelmente transfectadas.

O transativador reverso controlado por tetraciclina (rtTA) é uma fusão do repressor reverso Tet selvagem (rTetR) com o domínio de ativação VP16 (AD) do vírus Herpes simplex. O domínio VP16 converte TetR de um repressor transcripcional a um ativador transcripcional.

O segundo componente crítico é o plasmídeo de resposta (pTRE), o qual expressa o gene de interesse sob o controle do elemento de resposta a tetraciclina, ou TRE. O TRE consiste de uma sequência de 42 pares de base repetidas sete vezes contendo o tetO, e está localizado "upstream" ao promotor mínimo CMV (P_{minCMV}), o qual não tem o elemento de "enhancer" forte normalmente associado ao promotor de CMV. O rtTA liga-se ao TRE e ativa a transcrição do gene de interesse na presença de Doxíciclina. O mecanismo de ativação da transcrição no sistema Tet-On está mostrado no esquema abaixo:

O sistema de expressão Tet-On requer duas transfecções estáveis consecutivas para originar uma linhagem celular que contenha os genes que codificam para a proteína reguladora e o gene de interesse sob o controle do TRE. Na primeira transfecção o plasmídeo pTet-On é transfectado, e as colônias que apresentam alta expressão da proteína reguladora são expandidas e a seguir transfectadas com o vetor de

expressão pTRE mais o plasmídeo contendo o gene de resistência a higromicina, pTKHygro.

Transfecção de células Y-1

Para a transfecção, as células foram plaqueadas em uma densidade de 104 células/ml (aproximadamente 50% de confluência). A transfecção de DNA foi efetuada com lipofectina conforme recomendações do fornecedor (Gibco BRL). Como o plasmídeo pMMrasDN não carrega um marcador de seleção, este plasmídeo foi co-transfectado com 1 μ g de pSV2neo para conferir resistência a geneticina às células transfectadas. As células transfectadas eram subcultivadas para três placas contendo meio DME com 10% FCS, G418 (0,350 mg/ml). Colônias resistentes foram isoladas depois de 4 a 6 semanas de tratamento com G418 e foram propagadas na presença deste antibiótico.

O protocolo de transfecção transiente consiste em transfecção com o reagente Gene Porter 2 (**Gene Therapy Systems**) após 24h do plaqueamento em meio sem soro e sem antibióticos, de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram incubadas por 6h, com o reagente Gene Porter 2 mais 1 μ g do plasmídeo de interesse (pCAGrasDN ou pEGFP, para controle da eficiência de transfecção) e então, se adicionou o mesmo volume de DME 20% FCS, resultando em uma concentração final de 10% FCS, e incubou-se durante a noite. Na manhã seguinte as células foram carenciadas por 48h e fez-se o experimento.

Transformação de Bactérias por Choque Térmico:

Incubam-se 200 μ l de uma suspensão da bactéria DH5 α , tornada competente, com 100 ng do plasmídeo de interesse em gelo por 30

minutos. Transfere-se a suspensão para banho a 42°C por 1 minuto e novamente para gelo por 2 minutos. 1,0 ml de LB foi adicionado a cultura e incubou-se a 37°C por 1 hora. Plaqueou-se as bactérias em LB sólido contendo 100µg/ml de ampicilina e incubou-se em estufa a 37 °C durante a noite. Uma colônia foi isolada e expandida e o DNA plasmidial foi isolado e analisado por digestão com enzimas de restrição.

Preparação de DNA Plasmidial

Após transformação das bactérias com o plasmídeo de interesse, fez-se uma mini-prep utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep (**QIAGEN**). Os plasmídeos foram analisados por digestão enzimática, seguindo para cada enzima as condições recomendadas pelo fabricante. Após verificar a qualidade dos plasmídeos, fez-se uma preparação em grande escala. Inoculou-se meio de cultura LB com uma colônia isolada da bactéria que contém o plasmídeo de interesse e incubou-se durante a noite a 37°C sob agitação. Os plasmídeos foram isolados por lise alcalina seguida de gradiente de CsCl, conforme descrito em Sambrook et al, 1989.

Obtenção de Fragmentos de Plasmídeos para Preparação de Sonda

Os plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrição e a seguir resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram cortados do gel e colocados em membranas de diálise com TBE. Após eletroeluição dos fragmentos fez-se uma extração com fenol/clorofórmio para eliminar o brometo de etídeo. A seguir fez-se uma extração com clorofórmio, para eliminar o fenol e precipitou-se o DNA plasmidial com acetato de sódio 3M pH 4,8 (1/10 V/V) e etanol absoluto 100% (3/1 V/V) a -20°C. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos, e lavou-se o precipitado com etanol 70% gelado. Deixou-se a

temperatura ambiente para secar o precipitado e os fragmentos foram ressuspensos em água ou TE.

Sequenciamento

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

Teste de qui-quadrado

Experimentos com medidas de porcentagem de núcleos marcados (imunocitoquímica para c-Myc e c-Fos, imunofluorescência indireta para marcação com BrdU) foram analisados pelo Teste de Qui-Quadrado. Nestes casos, os valores de porcentagem de núcleos marcados obtidos nas diversas repetições do mesmo experimento foram agregados levando a uma amostra muito grande, ou seja, sempre maior que 1000. O Teste de Qui-Quadrado foi aplicado comparando-se a porcentagem de núcleos marcados em cada par de condições, na presença e ausência de dexametasona, com um grau de liberdade.

Resultados

Caracterização dos vetores que expressam a proteína dominante negativa H-ras Asn17 (RasN17)

Para confirmar a identidade do vetor pMMrasDN, foi realizado o mapa de restrição deste (figura 7). A sequência para H-ras Asn17 clonada no vetor de expressão pMMrasDN foi sequenciada utilizando-se o Kit Big Dye, tomando-se especial cuidado com a sequência do códon 17, a qual contém a substituição de serina por asparagina que confere o caráter dominante negativo à proteína codificada por esta sequência (figura 8). Como pode ser verificada a partir das figuras 7 e 8 a sequência clonada no vetor pMMrasDN corresponde àquela contida em bancos de dados para o gene H-ras, utilizando o programa Blast 2 sequences. Além disso, realizou-se o mapa de restrição para o vetor pCAGrasDN, o qual foi utilizado em transfecções transientes.

Figura 7. **Caracterização dos vetores pMMrasDN e pCAGrasDN.** Os vetores pMMrasDN e pCAGrasDN contêm a seqüência para a proteína dominante negativa ha-ras Asn17. a) mapa do vetor pMMrasDN; b) mapa do vetor pCAGrasDN; c) digestão de 0,5µg do vetor pMMrasDN com as seguintes enzimas: PM – Peso Molecular 1kb ladder, lane 1 – pMMrasDN não digerido, lane 2 – AccI, lane 3 – NcoI, lane 4 – Kpn I, lane 5 – PvuII, lane 6 – AccI/NcoI, lane 7 – Δras não digerido, lane 8 – Δras digerido com PstI, lane 9 – Δras digerido com HindIII, lane 10 – Δras digerido com SalI. As enzimas AccI, NcoI, KpnI e PvuII apresentam sítios únicos, os quais localizam-se dentro do inserto. d) digestão de 0,5µg do vetor pCAGrasDN com as seguintes enzimas: PM – Peso Molecular 0,5kb ladder, lane 1 – pCAGrasDN não digerido, lane 2 – BamHI, lane 3 – EcoRI, lane 4 – HindIII, lane 5 – BamHI e EcoRI, lane 6 – BamHI e HindIII.

Os “primers” GTG CCT GTT GGA CAT CCT GG 3 (“downstream primer”) e AGG GTT CAG CTT CCG CAG C 3’ (“upstream primer”) foram utilizados para seqüenciar o gene de H-ras Asn-17 a partir do vetor pMMrasDN, aqui mostramos o cromatograma referente ao seqüenciamento da fita codificante utilizando o “upstream primer”, o que resultou na leitura da região onde se encontra a mutação.

Figura 8. **Seqüenciamento do vetor pMMrasDN.** Cromatograma representando a porção 5', códon 1 – 23 (porção viral do dominante negativo RasN17). Códon assinalado corresponde ao códon 17, onde houve a substituição do aminoácido serina por asparagina.

Efeitos de RasN17 sobre o crescimento de células Y-1

Devido aos altos níveis de expressão de K-Ras, questionava-se se seria possível, utilizando-se o dominante negativo de H-Ras, bloquear ou ao menos diminuir os níveis de ativação de Ras-GTP. Assim, fomos verificar, através da transfecção transiente de células Y-1 com o vetor pCAGRasDN se através da expressão do dominante negativo seria possível bloquear a entrada na fase S do ciclo celular. Como pode ser visto a partir da figura 9 a expressão da proteína dominante negativa bloqueou a entrada em S como já observado para outros sistemas celulares, demonstrando assim, que os níveis constitutivos de K-Ras-GTP são passíveis de serem reduzidos o suficiente para bloquear a transição G0→G1→ S em células Y-1.

Figura 9. **Entrada em S em células Y-1 transfectadas com o vetor pCAGrasDN.** Células Y-1 foram transfectadas, transientemente com H-ras Asn-17 sob o controle do promotor de β -actina. As células foram plaqueadas em lamínulas e 24 horas após foram transfectadas com 1 μ g de pCAG Δ ras (mock) ou 1 μ g de pCAGrasDN, realizou-se também uma transfecção, nas mesmas condições com GFP, para verificar a eficiência de transfecção. Após vinte e quatro horas de carenciamento as células foram estimuladas com FGF-2, sendo adicionado 100 μ M de BrdU 12 horas depois. 24 horas após a adição do estímulo, as lamínulas foram processadas e o número de células marcadas contado. A eficiência de transfecção foi a 60%. O controle refere-se às células mantidas em meio livre de soro. C - Controle. F – FGF-2 5ng/ml.

Tendo-se confirmado a viabilidade da utilização da proteína dominante negativa RasN17 na inibição da proteína Ras endógena o passo a seguir foi a transfecção estável de células Y-1 com este mutante. A atividade biológica do gene dominante inibitório RasN17 foi investigada pela transfecção de células Y-1 com o gene mutante inserido em dois vetores de expressão em mamíferos, no qual RasN17 foi expressa a partir do promotor constitutivo de β -actina (pCAG/SB) ou a partir do promotor induzível MMTV-LTR (pMMrasDN). Em cada um dos casos os transformantes foram selecionados para resistência a G418 conferida

por um gene Neo^r introduzido por co-transfecção do vetor pSV2neo. Células controle foram transfectadas com os respectivos vetores vazios (p Δ rasDN) mais pSV2neo. Com a transfecção das células Y-1 com o vetor pCAGrasDN esperava-se que, caso fosse verdadeiro para Y-1 o efeito inibitório que a expressão de H-ras Asn-17 tem sobre o crescimento (efeito observado, por exemplo, para 3T3), a transfecção das células com o gene H-ras Asn-17 sob o controle do promotor de β -actina gerasse um número menor de colônias. Fato este que pode ser observado a partir da tabela 1. Estes resultados são consistentes com o fato de que significativa expressão de RasN17 é incompatível com proliferação celular.

Como já observado em experimentos similares realizados com células NIH3T3 (Feig and Cooper, 1988), o número de colônias de células Y-1 resistentes a G418 foi reduzido pela transfecção com o mutante H-ras Asn-17 (RasN17) (Tabela 1). Como esperado, verifica-se que as células transfectadas com o vetor pCAGrasDN apresentam um número menor de colônias, quando comparado àquelas células transfectadas com o vetor pMMrasDN. Contudo, provavelmente devido a problemas de vazamento (sabidamente já observado para este sistema), as células transfectadas com o vetor pMMrasDN também apresentam um número pequeno de colônias (ainda que maior que o observado para o vetor pCAGrasDN), quando comparada às células transfectadas com o vetor vazio.

Porém, o fato de se transfectar as células com um gene deletério sob o controle de um promotor induzível, de antemão já nos garante uma vantagem seletiva, uma vez que, aquelas células onde estiver ocorrendo um grande vazamento, serão automaticamente eliminadas. Restando somente aquelas que ou apresentam um basal baixo da proteína de interesse (o qual pode sofrer incrementos de indução), ou que não

expressam a proteína de interesse. A partir da figura 10 observa-se que realmente é isto que ocorre.

Dado os efeitos inibitórios sobre o crescimento de H-ras Asn-17, o fato de expressar a proteína constitutivamente torna praticamente impossível o isolamento de um clone que apresente uma taxa de expressão da proteína mutante em quantidades suficientes para, pelo menos atenuar, a proteína Ras endógena, deste modo em todos os experimentos subseqüentes utilizou-se subclones de Y-1 transfectados com o vetor pMMrasDN, no qual o mutante RasN17 encontra-se sob o controle do promotor MMTV-LTR, o qual é induzível por dexametasona.

N° de colônias	Placa 1	Placa 2	Placa 3
pMMrasDN	29	32	33
pMMΔrasDN	138	126	151
pCAGrasDN	11	13	10
pCAGΔrasDN	152	144	141

Tabela 1. Inibição da formação de colônias resistentes a G418.

Células Y-1 foram transfectadas com 1 μ g dos vetores pMMrasDN ou pCAGrasDN mais 0,1 μ g de pSV2Neo. Três dias após a transfecção as células foram subcutivadas em três placas p100 e colocadas na presença de 700 μ g/ml de G418. Após 14 dias o número de colônias foi determinado e algumas destas colônias foram coletadas para melhor análise.

Caracterização da expressão da proteína mutante H-ras Asn-17 em subclones celulares de Y-1.

A figura 10 mostra uma curva de dose resposta para dexametasona. Como pode ser observado a partir desta figura percebe-se que existe uma correlação direta entre quantidades crescentes de dexametasona e a expressão da proteína dominante negativa. Ocorrendo um aumento máximo na presença de $0,5\mu\text{M}$ de dexametasona, a qual já se encontra em concentrações saturantes. Esta concentração foi adotada em todos os experimentos aqui descritos.

Figura 10. **Curva de dose resposta para dexametasona.** O subclone Ras3.1 e a célula controle $\Delta\text{Ras3.3}$ foram carenciados para soro por 48 horas e 24 horas antes do término do carenciamento adicionou-se diferentes concentrações de dexametasona (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M). As células foram processadas para Western Blot. Cada "lane" contém $100\mu\text{g}$ de proteína total a qual foi detectada utilizando-se o anticorpo policlonal específico para H-ras.

Os níveis de expressão da proteína H-Ras foram analisados utilizando-se um anticorpo específico para a proteína H-Ras por Western Blot (Figura 11). Como mostrado na figura 11, estes clones apresentaram aumentos significativos nos níveis da proteína H-Ras após 24 horas de tratamento com $0,5\mu\text{M}$ de dexametasona, quando comparado às células controle, na

qual, sob as condições utilizadas, não foi possível detectar a proteína H-Ras endógena, significando que os altos níveis da proteína H-Ras detectados nos clones RasN17, deve-se à expressão da proteína exógena.

Quando da seleção dos subclones de Y-1 transfectados com RasN17, pensou-se em escolher aqueles que apresentassem um basal baixo da proteína exógena e também que a expressão de RasN17 fosse fortemente induzível. Porém estes níveis de expressão deveriam ser suficientemente grandes para atenuar os níveis de ativação de K-Ras, sem contudo abolir a resposta, posto que isto dificultaria a observação dos prováveis efeitos da amplificação de K-ras sobre a regulação do ciclo celular em células Y-1. Pensando nisso, foram escolhidos dois clones, os quais apresentam níveis de expressão da proteína dominante negativa diferentes. Para assegurar que não estávamos trabalhando com clones de origem da mesma célula mãe, optou-se por utilizar clones de placas diferentes, aqui nomeados Ras 1.5 e Ras 3.1. Os clones transfectados com o vetor vazio foram chamados de Δ Ras.

Figura 11. **Expressão de RasN17 em subclones de células Y-1.** Células controle (Y-1, ΔRas 2.1, ΔRas 3.3) e células transfectadas com pMMraDN (Ras 1.1, Ras 1.2, Ras 1.3, Ras 1.4, Ras 1.5, Ras 1.6, Ras 1.8, Ras 2.1, Ras 2.3, Ras 2.4, Ras 3.1 e Ras 3.3) foram cultivadas e processadas para Western Blot. As células foram mantidas em carenciamento por 48 horas e onde indicado, adicionou-se 0,5μM de dexametasona 24 horas antes da lise celular. Cada "lane" contém 100μg de proteína total e a membrana foi analisada com um anticorpo policlonal anti H-ras. O sinal (-) corresponde a não adição de dexametasona e o sinal (+) corresponde a adição de dexametasona

A fim de ter-se um sistema de transfecção no qual o indutor não tem um efeito descrito sobre a expressão de outros genes, o que pode ocorrer com hormônios esteróides, utilizou-se o sistema Tet-On para transfectar células Y-1. Neste sistema utilizam-se proteínas reguladoras de procariotos, o que teoricamente, faz com que elas ajam especificamente

sobre o gene de interesse, provavelmente devido ao fato das seqüências reguladoras não existirem no genoma de eucariotos.

Células Y-1 transfectadas com o vetor pTet-On, foram utilizadas para obtenção de clones induzíveis de H-ras Asn-17. Assim, estas células foram co-transfectadas com o vetor pTRErasDN e pTKhygro. Após seleção com geneticina e higromicina, os clones obtidos, em um total de 3, foram isolados para posteriores estudos. O número de clones obtidos (figura 12), bem menores quando comparado às células transfectadas com os vetores pCAGrasDN e pMMrasDN, deve-se provavelmente, além dos efeitos deletérios do dominante negativo, também à seleção dupla pelos antibióticos geneticina e higromicina.

Os clones obtidos foram expandidos e estudados para verificar os níveis de indução da proteína Ras17N. Assim, as células foram plaqueadas e carenciadas para soro por 48 horas, neste momento adicionou-se doxiciclina (o indutor para o sistema Tet-On) nas concentrações de 1 e 10 µg/ml.

Como pode ser verificado a partir da figura 11A não foi possível obter nenhum clone induzível utilizando-se este sistema, uma vez que, dos clones obtidos existem aqueles que não expressam a proteína dominante negativa, e aqueles cujo basal da proteína Ras17N não pode sofrer maiores incrementos após a indução com doxiciclina, fato que já foi observado em nosso laboratório utilizando-se este sistema para indução de outros genes.

Figura 11A. **Expressão de RasN17 após indução com doxiciclina.** Células transfectadas com H-ras Asn-17 utilizando-se o sistema Tet-On foram plaqueadas e carenciadas para FCS por 48 horas. Neste momento adicionou-se 1 ou 10μg de doxiciclinas às células, a qual foi mantida no meio por 48 horas. Após este período as células foram lisadas em tampão RIPA e 100μg de proteína total foram utilizadas para análise por Western blot. A proteína H-Ras foi detectada utilizando-se um anticorpo policlonal específico para a mesma.

Deteccção específica de Ras-GTP por Gst-RBD.

A fim de determinar a atividade de Ras nós fizemos uso da interação de alta afinidade de Ras-GTP pelo domínio de ligação de Raf quinase a Ras (figura 6). Os subclones Ras 1.5 e Ras 3.1 foram estimulados com FGF-2 ou ACTH, e o estado de ativação de Ras foi verificado utilizando-se a proteína de fusão GST-RBD ligada a "beads" de glutationa sefarose, como descrito em métodos.

Devido à amplificação gênica de K-ras, células Y-1 apresentam altos níveis de expressão da proteína K-Ras, o que faz com que estas células apresentem, mesmo na ausência de qualquer estímulo mitogênico, quantidades de Ras ligada a GTP equivalentes a aquelas quando as células são estimuladas, não sendo possível detectar qualquer incremento de ativação, independente do tratamento empregado. Como verificado em nosso laboratório estes níveis variam de 8 - 15%, não havendo variação neste valor após adição de FGF-2, por exemplo.

Como já amplamente descrito para outros sistemas celulares, a ativação de Ras por FGF-2 envolve a ativação de Sos (um fator de troca de nucleotídeos guanina para Ras, o qual, em princípio não distingue entre os membros da família, ligando-se a eles com igual afinidade). Assim, quando da montagem dos experimentos para verificar o estado de ativação de Ras, esperávamos que a indução da expressão de RasN17 por dexametasona, levasse a uma diminuição nos níveis de Ras-GTP, uma vez que a proteína Ras endógena estará competindo com RasN17 pela ligação a GEF. Porém, como já descrito na introdução, somente as diferenças de afinidade de RasN17 por GTP/GDP e GEF, não são suficientes para que ele seja um bom dominante negativo, ou seja, como a proteína Ras endógena e RasN17 estão competindo por um mesmo alvo, a inibição do Ras endógeno só será efetiva se expressão de RasN17 for suficientemente alta.

Assim, a partir da figura 12 podemos observar que a indução de RasN17 leva a uma diminuição nos níveis de ativação de Ras. Normalmente, quando se trabalha com uma célula que apresenta níveis normais das proteínas Ras, para conseguir-se detectar Ras-GTP tem-se que trabalhar com uma quantidade de proteína total acima de 2mg. Aqui, estamos realizando os experimentos com 300µg de proteína total, quantidade esta que torna inviável a detecção de H-ras, visto que ela encontra-se em quantidades normais. Além disso, quando se realiza "stripping" da membrana utilizada, e usando-se o anticorpo contra Ha-ras não é possível observar nenhum sinal. Assim, a maior parte da proteína Ras que está sendo detectada por Western blot utilizando o anticorpo Y13 259 corresponde a K-Ras.

Como mostrado na figura 12, na ausência de dexametasona estas células comportam-se como Y-1, apresentando níveis não variáveis de Ras-GTP, seja quando tratadas com FGF-2 ou ACTH. Porém, quando da adição de dexametasona, devido à redução dos níveis Ras-GTP gerado

pela competição com RasN17 por GEF, podemos perceber uma clara diferença entre a célula carenciada e a célula que foi estimulada, com relação ao estado de ativação de Ras.

Assim, podemos verificar que FGF-2 leva a uma ativação lenta e crescente de Ras, a qual mantém-se. Em contraste, ACTH induz a ativação de Ras de uma maneira rápida e transiente.

Um fato que deve ser observado é que a intensidade com que conseguimos abaixar os níveis de Ras-GTP é dependente dos níveis de expressão de RasN17, ou seja, o clone Ras 3.1 apresenta níveis de indução de RasN17 maiores que aqueles encontrados em Ras 1.5 (figura 11), sendo, portanto aquele que apresenta um grau maior de inibição sobre a ativação da proteína Ras endógena. Ainda, como o dominante negativo, apesar de ainda ser capaz de ligar-se a GTP, não consegue ligar-se a outros efetores de Ras (como Raf-1, por exemplo), a proteína Ras aqui exibida corresponde à proteína endógena.

Figura 12. **Cinética de ativação de Ras por FGF-2 e ACTH.** Células controle e células RasN17 foram carenciadas para soro por 48 horas e liberadas da quiescência pela adição de 5ng/ml de FGF-2 ou 10^{-9} M de ACTH pelos tempos indicados na figura. A) Estado de Ativação de Ras endógeno no subclone Ras 3.1. O nível de Ras ligado a GTP foi medido pela extração de proteína total em períodos de tempo diferentes, usando-se uma matriz de afinidade ("beads" de glutathiona sefarose) complexada ao domínio de ligação de Raf-1 a Ras (GST-RBD). B) Estado de ativação de Ras endógeno no subclone Ras 1.5. A proteína Ras foi identificada por precipitação de 300 μ g de proteína total por Gst-RBD seguido por imunoblotting contra o anti-Ras monoclonal Y13-259.

Regulação da atividade de ERK1 e ERK2 por FGF-2 e ACTH

É largamente documentado que proteínas Ras ativadas são capazes de disparar a ativação de inúmeras famílias de proteínas, mais notavelmente, as vias de Raf/ERK, Ral-GDS e PI3-K. A melhor

caracterizada destas, a via de Raf/ERK sabidamente induz a transcrição de genes que regulam o ciclo celular, por exemplo, fos e myc.

Assim, fomos examinar se a redução parcial da atividade de K-ras interfere na ativação de ERK. Como mostrado na figura 13, após estímulo com FGF-2, a quantidade da forma ativa de p44^{ERK1} ou p42^{ERK2} era máxima em 5 minutos, declinando gradualmente e alcançando níveis próximos ao basal em 4 horas. Um exame da ativação de ERK estimulada por FGF-2 após pré-tratamento com dexametasona, mostrou uma diminuição moderada na ativação de ERK, sem contudo alterar a cinética de ativação.

ACTH por outro lado, quando comparado a FGF-2 mostra-se um fraco indutor da ativação de ERK (lembre-se que esta figura corresponde a uma exposição de 1 hora, enquanto que para detectar ERK1/2 estimuladas por FGF-2 faz-se exposições que variam de 30 segundos a dois minutos). Porém, esta fraca ativação de ERK parece ser dependente da ativação de Ras, visto que a presença de dexametasona, reduz ainda mais a quantidade de ERK fosforilada. Contudo, apesar destes níveis já serem baixos, a presença da forma dominante negativa de Ras não é suficiente para reduzi-las a níveis não detectáveis.

Ao observarmos a cinética de ativação de K-Ras (figura 12) por FGF-2, percebemos que esta alcança níveis máximos entre 30 e 60 minutos, o que não concorda com a rápida ativação de ERK1 e ERK2 (em 5 minutos). Este fato, associado à ausência de um basal de ERK1/2 apesar dos níveis constitutivos de K-Ras-GTP leva-nos a concluir que, em células Y-1, a ativação de ERK1/2 não é regulada por K-Ras, e que outro membro da família, possivelmente, H-Ras, estaria envolvido na ativação de ERK1 e ERK2. Outro fato que vem corroborar esta hipótese é a verificação de que apesar de ACTH levar a ativação de K-Ras em 5 minutos isto não está associado a uma forte ativação de ERK1 e ERK2 por este hormônio.

Assim, poderíamos pensar que a ativação de Ras estaria ocorrendo em ondas, ou seja, H-Ras e K-Ras estariam sendo ativados com cinéticas diferentes. Assim, existiria uma ativação rápida de H-ras (até 5 minutos) seguida de uma ativação mais lenta de K-Ras (a partir de 30 minutos). Para confirmar esta hipótese faz-se necessário verificar a cinética de ativação de H-Ras em células Y-1.

Figura 13. Perfil temporal da ativação de ERK1 e ERK2 em resposta a estimulação por FGF-2 e ACTH em células Y-1. Células carenciadas para soro por 48 horas eram incubadas com FGF-2 (5ng/ml) ou ACTH (10^{-9} M) pelo período de tempo indicado, e uma igual quantidade de proteína era analisada. Onde indicado, 0,5 μ M de dexametasona (dex) foi adicionado 24 horas antes da adição do estímulo. O estado de ativação de ERK 1 e 2 foi estudado por Western usando-se anti-ERK1, anti-ERK2 (MAPK total) e também um anticorpo específico para ERK fosforilada. As exposições referentes a ERK fosforilada, correspondem a uma exposição de 30 segundos (para FGF-

2) e 1 hora (para ACTH). a) ativação de ERK1/2 por FGF-2; b) ativação de ERK1/2 por ACTH; c) ERK1/2 total.

Expressão de Myc em subclones de Y-1 após a transfecção da proteína dominante negativa RasN17

Para analisar os efeitos da proteína RasN17 sobre a expressão do gene e da proteína c-myc, realizou-se experimentos de Northern blot (Figura 14) e Imunocitoquímica, respectivamente (Figura 15). Sabidamente, as células Y-1 apresentam um basal de c-myc, na condição carenciada, tanto de mRNA, como proteína, e com estes experimentos gostaríamos de verificar se a expressão do dominante negativo poderia interferir na manutenção deste basal.

Quando olhamos para os níveis da proteína c-Myc nas células mantidas em meio de carenciamento, por Imunocitoquímica, (Figura 15), notamos uma nítida diminuição do basal da proteína c-Myc, o qual porém não foi possível reduzir a zero. O que de certo modo condiz com a nossa hipótese, uma vez que, nas condições utilizadas nos experimentos aqui apresentados não foi possível reduzir a níveis não detectáveis o basal de Ras-GTP (ver figura 12). Por outro lado, quando olhamos para o basal do mRNA de c-myc percebemos que a presença do dominante negativo não teve efeitos sobre a manutenção deste basal, o que se relaciona com o já bem descrito que Ras estaria regulando a estabilidade da proteína c-Myc (Sears, 2002).

FGF-2 ativa a expressão tanto do m-RNA de c-myc como da proteína. Fato este que pode ser verificado nas figuras 14 e 15. Porém, quando as células Ras 1.5 e Ras 3.1 são tratadas com dexametasona, observa-se uma alteração na intensidade da expressão de c-myc, tanto no nível do mensageiro, como de proteína. Isto é esperado uma vez que foi

mostrado por Ana Lepique, em nosso laboratório, que a expressão de c-Myc por FGF-2 é dependente da via de ERK/MAPK, e aqui mostramos que a diminuição nos níveis de Ras ativado, leva em consequência a uma redução na ativação de ERK.

Uma importante diferença entre os efeitos de FGF-2 e ACTH referem-se à expressão do gene c-myc. ACTH, tem efeitos opostos àqueles observados para FGF-2, fortemente desestabilizando a proteína c-Myc, sem, contudo, interferir com a transcrição de c-myc (Lepique, 2000). Assim, observando-se a figura 14, podemos perceber que a presença de dexametasona não modifica a resposta já anteriormente observada de c-myc a ACTH. Ou seja, ACTH, nas condições aqui realizadas, não tem efeitos sobre a transcrição do gene c-myc.

A expressão da proteína c-Myc, por outro lado, é inibida pela presença de ACTH, inibição esta que se torna mais aparente quando células estimuladas por FGF-2 são, simultaneamente, tratadas com ACTH. Já havia sido observado anteriormente, que este efeito inibitório de ACTH sobre a expressão da proteína c-Myc ocorria via PKA, contudo a partir da figura 15 observamos, para os dois clones, uma menor inibição de c-Myc em tratamentos conjuntos de ACTH e FGF-2 quando na presença de dexametasona, sugerindo a participação de Ras nos efeitos de ACTH sobre FGF-2.

Figura 14. Efeito de RasN17 sobre a expressão de c-myc. Células carenciadas por 48 horas, foram tratadas com 5 ng/ml de FGF-2. 10^{-9} M de ACTH 1-39 ou ambos e coletadas para extração de RNA 4 horas após o estímulo. RNA total citoplasmático foi analisado por Northern Blot, onde o cDNA de myc e H-ras Asn-17 foi utilizado como sonda. GAPDH foi utilizado como controle interno. C - células carenciadas. F - células tratadas com FGF-2. FA - células tratadas com FGF-2 e ACTH simultaneamente. A - células tratadas com ACTH. Os gráficos correspondem à quantificação de cada experimento mostrado ao lado.

Para o cálculo dos valores relativos apresentados no gráfico, a partir dos valores obtidos por densitometria fez-se a razão c-myc/GAPDH o que permitiu a correção de possíveis diferenças de quantidade de material aplicado por cada condição no gel – representado no gráfico como (c-myc/GAPDH).

Figura 15. **Efeitos de FGF-2 e ACTH sobre a expressão de c-myc em clones RasN17.** As células controle Δ Ras 3.3 e os clones Ras1.5 e Ras 3.1 foram plaqueadas em lamínulas e carenciadas por 48 horas. Após este período as células foram estimuladas 5ng/ml FGF (F)., 10^{-9} M ACTH (A) ou ambos (FA), durante 4 horas. (C) refere-se à célula mantida em meio de carenciamento. Após este período as lamínulas

foram coletadas e tratadas para detecção da proteína c-Myc utilizando-se um anticorpo específico para esta. Estes experimentos referem-se à média de dois experimentos independentes.

Expressão de c-fos em subclones de Y-1

Estimulação de células Y-1 por FGF-2 ou ACTH leva a uma rápida indução de c-fos, e o produto deste gene está envolvido na regulação de outros genes (genes de resposta secundária) que são diretamente responsáveis pelas respostas observadas por estes agentes. Desde que a expressão de RasN17 inibe a ativação de ERK1 e 2, nós nos perguntamos se a indução de c-fos seria igualmente afetada.

Como esperado, imunocitoquímica nos mostrou que c-fos é rapidamente induzido por FGF-2 e ACTH. Em contraste, nos subclones expressando RasN17, a indução de c-fos foi inibida. Interessantemente, a indução de c-fos por FGF-2 não foi mais sensível à inibição pelo gene mutante de ras que a indução por ACTH, ambos sendo igualmente inibidas. Como c-Fos é também induzido pela via de PKA quando da adição de ACTH, esperava-se que a inibição do dominante negativo sobre a indução de c-Fos fosse menor, pois c-Fos está sendo induzido por outra via além da de MAPK. Com isso pode-se concluir que apesar de ERK ser fracamente induzida por ACTH esta indução é suficiente para ativar c-Fos, apesar de não ocorrer o mesmo com a expressão de c-Myc.

Figura 16. **Indução de c-Fos depois de tratamento com FGF-2 e ACTH em subclones de Y-1.** A célula controle Y-1 e os clones Ras1.5 e Ras 3.1 foram plaqueadas em lamínulas e carenciadas por 48 horas para soro. Após este período as células foram estimuladas 5ng/ml FGF (F), 10^{-9} M ACTH (A) ou ambos (FA), durante 1 hora. (C) refere-se à célula mantida em meio de carenciamento. Após este período as lamínulas foram coletadas e tratadas para detecção da proteína c-Fos utilizando-se um anticorpo específico para esta. Estes gráficos referem-se a soma de dois experimentos independentes.

Efeito de RasN17 sobre a progressão no ciclo celular de células

Y-1

A fim de verificar os efeitos da proteína mutante RasN17 sobre a entrada em S em resposta a FGF-2 e ACTH, as células controle Δ Ras 3.3 e dois dos clones: Ras 1.5 e Ras 3.1, foram plaqueados em lamínulas e carenciados para soro por 48 horas. Após este período FGF-2 e/ou ACTH foram adicionados ao meio, e, então, 10 horas depois se adicionam 100 μ M de BrdU. 24 horas após o início do estímulo as células foram fixadas.

Um dos objetivos deste trabalho era verificar se com a diminuição dos níveis de RasGTP, era possível diminuir a porcentagem de células entrando em S, na condição carenciada. Nota-se que nos clones separados para melhor análise, Ras 1.5 e Ras 3.1, ocorre uma diminuição que varia de 60 – 70% quando da adição de dexametasona. Não sendo contudo possível abaixar estes níveis a zero, o em princípio, é esperado uma vez que pelos experimentos para verificar o estado de ativação de Ras não foi possível eliminar completamente o basal de Ras-GTP quando mantém a célula em meio de carenciamento.

Por outro lado a indução de RasN17, leva a uma diminuição na entrada em S em células tratadas com FGF-2, o mesmo não sendo observado na célula controle sob as mesmas condições. Este resultado é esperado quando lembramos que a ativação do receptor de FGF-2 leva a um aumento nos níveis de Ras-GTP. Pelos dados obtidos através dos ensaios de Ras-GTP, a resposta para FGF-2 é esperada uma vez que nestes clones é possível notar um aumento nas quantidades de Ras-GTP quando na presença de FGF-2. Porém, a princípio, os efeitos inibitórios de ACTH sobre a progressão do ciclo celular, independe dos níveis altos de Ras-GTP nestas células, uma vez que a diminuição nestes níveis, devido à presença da proteína inibitória, não altera a resposta observada

quando do tratamento destes clones com ACTH somente, ou ACTH e FGF-2.

Figura 16. **Entrada na fase S por incorporação de BrdU após estímulo por FGF-2 e/ou ACTH.** A porcentagem de núcleos marcados foi obtida a partir da relação do número total de células (DAPI) e o número de células marcadas (BrdU/fluoresceína). Células Y-1 e os

clones de Ras17N foram plaqueados sobre lamínulas e carenciados para soro por 48 horas. As células foram, então, estimuladas com 5 ng/ml FGF-2 (F), 10^{-9} M ACTH (A) ou ambos (FA), e então, 10 horas após o estímulo foram incubadas na presença de 100 μ M de BrdU, por até 24 horas após a adição do estímulo. O controle refere-se às células mantidas em meio livre de soro. Estes gráficos referem-se à média de dois experimentos independentes.

Realizaram-se também experimentos de cinética de entrada em S que tinham como objetivo verificar se a diminuição nos níveis de ativação K-Ras resultaria em alguma alteração no tamanho de G1. Para isso procedeu-se como descrito em métodos. Células Y-1 têm tipicamente um G1 em torno de oito horas, como verificado em trabalhos anteriores em nosso laboratório, fomos verificar se a expressão de RasN17 teria algum efeito sobre o tamanho de G1. Como pode ser verificada a partir da figura 17, a expressão da proteína dominante negativa resulta em alterações no tamanho de G1. Com este experimento verifica-se novamente uma redução no número de células que estão entrando em S na condição carenciada, a qual apresenta uma tendência maior de crescimento na ausência de dexametasona. Nota-se ainda, uma diminuição na porcentagem de núcleos marcados quando as células são estimuladas por FGF-2 na presença de dexametasona.

Figura 17. **Cinética da entrada na fase S por incorporação de BrdU.** A porcentagem de núcleos marcados foi obtida a partir da relação do número total de células (DAPI) e o número de células marcadas (BrdU/fluoresceína). O subclone Ras 3.1 foi plaqueado sobre lamínulas e carenciados para soro por 48 horas. As células foram, então, estimuladas com 5 ng/ml FGF-2 (F), então, incubadas na presença de 100 μ M de BrdU, por até 24 horas após a adição do estímulo. Um par de lamínulas de cada condição foi coletado a cada duas horas. O controle (C) refere-se às células mantidas em meio livre de soro.

Discussão

Em células Y-1 K-Ras é o membro majoritário da família de proteínas Ras, a qual é composta por H-Ras, N-Ras e K-Ras (K-RasA e K-Ras B). A função de ligação a GTP e interações com moléculas efetoras estão primariamente localizadas dentro da porção amino terminal da proteína. Nesta região existem poucos aminoácidos diferentes entre os três membros da família. Este fato, junto com a observação de que mutações oncogênicas podem ocorrer em qualquer um dos membros, sugere que eles podem funcionar de uma maneira idêntica.

O dominante negativo aqui utilizado é uma forma mutante de H-Ras, e ele compete com o Ras endógeno pela ligação a GEF. Assim, o problema inicial que deveria ser superado refere-se à questão se a quantidade da proteína dominante negativa seria suficiente para interferir com a ativação da proteína K-Ras, a qual se encontra em altos níveis em células Y-1, pois só assim seria possível interferir com sua função.

Com os Westerns contra H-Ras (o qual não é passível de detecção nas condições utilizadas) podemos perceber que este se encontra em concentrações irrisórias quando comparada a K-Ras, assim, mesmo quando usando um anticorpo contra todas as formas de Ras, a forma principal que se encontra representada corresponde a K-Ras. Assim, com os experimentos de ativação de Ras podemos verificar que a quantidade de RasN17 expressa é suficientemente grande para atenuar a ativação de K-Ras, sem contudo inibir sua completa ativação, como pode ser verificado quando as células são estimuladas por FGF-2, o qual aumenta os níveis de Ras-GTP sobre o basal. Com isto verificamos que FGF-2 promove uma ativação tardia e lenta de Ras, enquanto ACTH leva a uma rápida, porém transiente ativação de Ras.

Em células Y-1, a via das MAPKs, encontra-se finamente regulada, apesar de Raf-1, a primeira quinase desta via, ser regulada por Ras-GTP, e portanto estar sujeita aos altos níveis de K-Ras. Este fato contudo, não parece ter nenhum efeito sobre a ativação de ERK 1 e 2 as

quais apresenta um basal não detectável na condição carenciada, sendo robustamente ativada por FGF-2. Akt por outro lado, uma quinase que é um dos alvos de PI3K, encontra-se constitutivamente ativada nestas células, e foi mostrado por Fábio Forti, em nosso laboratório que o estado de ativação de Akt é dependente de Ras. Estaria aí a chave do enigma? Poderiam estas duas vias está sendo ativada por membros diferentes de Ras? Foi mostrado para outro sistema que H-Ras e K-Ras ativam diferencialmente Raf-1 e PI3-K, tendo H-Ras uma afinidade preferencial por PI3-K e K-Ras por Raf-1, o que não explicaria o fato aqui relatado. Por outro lado, dois grupos demonstraram que Akt regula a via de Ras-Raf, demonstrando uma inibição dependente de PI3-K de Raf-1 (Rommel, 1999, Zimmermann, 1999). Seria por este caminho que a via de MAPK, encontra-se finamente regulada? Porém, nossos resultados levam a uma hipótese mais simples e que poderia facilmente ser testada: em células Y-1 H-Ras estaria sendo responsável pela ativação da via Raf-1/ERK1 e ERK2 enquanto que K-Ras levaria a ativação da via de PI3K/Akt.

A diminuição nos níveis de Ras-GTP acarreta uma ligeira diminuição na ativação de ERK 1 e 2, tanto por FGF-2 como por ACTH, sem contudo alterar a cinética de ativação. Não é surpreendente, pois que o estímulo de c-Myc e c-Fos por FGF-2 mostre-se reduzido quando da adição de dexametasona. Contudo, é inesperado o fato de ACTH interferir menos com o estímulo de FGF-2 quando em tratamentos conjuntos, este fato é observado tanto para a expressão da proteína c-Myc, como para entrada em S, denotando existir uma relação direta entre estes dois eventos.

Uma importante diferença entre os efeitos de FGF-2 e ACTH referem-se à expressão do gene c-myc. FGF-2 leva a um aumento na expressão do gene e a estabilização da proteína c-Myc. ACTH, por outro lado, tem efeitos opostos, fortemente desestabilizando a proteína c-Myc, sem interferir com a transcrição gênica (Lepique, 2000). Fábio Forti (Forti et

al, 2002) verificou que ACTH promove a defosforilação/inativação de AKT. Seria por esta via que ACTH estaria interferindo no sinal enviado por FGF-2, inibindo a entrada em S e promovendo a degradação de Myc. Um evento inicial na resposta das células a estímulo com FGF-2 e ACTH, é a indução de c-fos, seguido pela indução de c-myc (no caso de FGF-2). A indução de c-fos por FGF-2 e ACTH foi detectavelmente alterada pela expressão de Ha-ras Asn-17. Apesar de ACTH induzir c-Fos, um componente importante na indução de proliferação celular, isto não é suficiente para induzir entrada em S, dado os efeitos observados sobre a ação de FGF-2. Assim, podemos mais uma vez chamar a atenção para a provável importância de myc na indução de proliferação celular em células Y-1.

No presente estudo nós demonstramos que a expressão induzida de H-Ras Asn-17 leva uma diminuição na quantidade de células entrando em S em células Y-1 estimuladas com FGF-2 e também em células carenciadas para soro. Estes resultados são consistentes com os estudos pioneiros de Stacey e colegas (Mulcahy et al, 1985) que demonstraram que a microinjeção de anticorpos neutralizantes anti-Ras na fase G1 de células NIH3T3 estimuladas com soro levava a parada em G1.

Foi possível verificar e confirmar o já anteriormente observado (Lepique et al, 2001) que ACTH tem efeitos inibitórios sobre entrada em S, efeitos esses que não podem ser revertidos pela presença do dominante negativo, mostrando com isso que esta inibição não depende de Ras. O que vai ao encontro do fato já documentado de que o bloqueio do ciclo celular por ACTH se daria por meio de PKA. Como estaria se dando esta inibição?

O segundo mensageiro cAMP é o melhor sinal intracelular estudado. Sua principal ação, a ativação de PKA, permite que sinais hormonais acoplem-se a eventos de fosforilação intracelular. A elevação hormonal dos níveis de cAMP é disparada pela subunidade $G\alpha_s$ de proteínas

heterotriméricas, as quais encontram-se associadas a receptores transmembranares de sete hélices. No estado em repouso, estes receptores ligam-se a subunidades $G\alpha s$ inativas, ligadas a GDP, que estão associadas com subunidades $\beta\gamma$ específicas. Após a ligação de ACTH, a troca de GDP por GTP converte a subunidade α em seu estado ativo, ligado a GTP, levando-a a ser liberada do receptor; em seu estado livre ela liga-se e ativa adenilato ciclases associadas à membrana. Ao mesmo tempo em que $G\alpha s$ dissocia-se de seu receptor, $\beta\gamma$ é liberada de $G\alpha s$ e pode ativar efetores independentemente de $G\alpha s$. A habilidade de receptores acoplados a Gs modularem a cascata de MAPK (ou ERK) oferece um mecanismo pelo qual as vias de sinalização acopladas a cAMP regulariam o crescimento celular. A melhor ação estudada de cAMP sobre ERK é inibitória e leva a um descréscimo na proliferação celular. Isto é conseguido, em parte, pela fosforilação dependente de PKA de Raf-1 sobre o resíduo de serina 43, o que desacopla Raf-1 de seu ativador Ras (Wu, 1993). Mostramos que ACTH é capaz de estimular a ativação de Ras, ativação esta que não é, por si só, suficiente ativar fortemente ERK (quando comparado a FGF-2), uma vez que ERK pode ser só fracamente detectada após estímulo com ACTH. Esta fraca indução pode ser devida a inibição de Raf-1 pela via de PKA.

Além disso ACTH, sob as condições aqui utilizadas, induz a ativação de Ras, por uma via que ainda nos é desconhecida. Foi mostrado para outros sistemas que a subunidade $\beta\gamma$ pode ativar Ras, apesar de não ter sido ainda verificado o mesmo para proteínas Gs, este poderia ser um caminho pelo qual Ras está sendo ativado. Qual o papel de Ras ativado por ACTH, uma vez que ele só ativa MAPK fracamente? Alguma outra molécula efetora de Ras, que não Raf-1 poderia estar sendo utilizada para levar o sinal de ACTH até o núcleo?

Conclusões

1. A expressão da proteína dominante negativa RasN17 em células Y-1 revelou-se um meio eficiente de bloquear a atividade das proteínas Ras endógenas, apesar da superexpressão de K-Ras. O uso criterioso de uma forma induzível de RasN17 permitiu reduzir os níveis crônicos de K-Ras-GTP e analisar as consequências fenotípicas da amplificação do proto-oncogene c-k-ras. Os resultados obtidos têm implicações potencialmente importantes.
2. Os níveis cronicamente elevados de K-Ras-GTP em células Y-1 acarretam: a) ativação constitutiva da via de PI3K→Akt/PKB e b) parcial desregulação da transcrição do proto-oncogene c-myc. Estes efeitos de K-Ras-GTP elevado parecem ser indispensáveis, e convergem para causar a desregulação parcial do ciclo celular exibido por células Y-1.
3. O fato de células Y-1 apresentarem uma regulação estrita da via de Raf-1→MEK→ERK1/2→c-fos→ciclina D-1, demonstra que K-Ras não é importante no controle de ERK1/2, cuja ativação parece ser mediada por H-Ras. Assim, levantamos a hipótese de que células Y-1, estacionadas na interfase G0/G1, aparentemente respondem a FGF-2 através da ativação de H-Ras nos primeiros minutos e de K-Ras entre 2 e 4 horas após o tratamento. Até onde sabemos nunca se relatou uma separação temporal e funcional entre K-Ras e H-Ras como apresentado nesta dissertação.
4. ACTH induz uma rápida e transiente ativação de K-Ras e provavelmente também de H-Ras. Esta observação pode contribuir para esclarecer os mecanismos de ativação de Ras através do receptor de ACTH. A literatura especializada mostra relatos isolados de ACTH ativando H-Ras, os quais foram pouco explorados.

Referências Bibliográficas

Armelin, H. A. 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70 (9): 2702 - 2706.

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

Barbacid, M. 1987. ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 779-827.

Charron, J., Malynn, B. A., Fisher, P., Stewart, V., Jeannotte, L., Goff, S. P., Robertson, E. J., Alt, F. W. 1992. Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene. *Genes Dev.* 6 (12A): 2248 – 2257.

Ciechanover, A. 1991. The ubiquitin-mediated system for intracellular protein degradation. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2 (3): 141 – 159.

Cole, M. D. 1986. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev. Genet.* 20: 361 – 384.

Cole, M. D. and McMahon, S. B. 1999. The Myc Oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 18: 2916 – 2924.

Coppola, J. A., Cole, M. D. 1986. Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment. *Nature* 320: 760 – 763.

Datta, S. R., Brunet, A. , Greenberg, M. E. 1999. Cellular survival a play in three Acts. *Gene Dev.* 13 (22): 2905 – 2927.

De Vries-Smith, A. M., Burgering, B. M., Leever, S. J., Marshall, C. J. and Bos, J. L. 1992. Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 357: 602 – 604.

Dhanasekaran, N., Heasley, L. E. and Johnson, G. L. 1995. G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocrine Rev.* 16, 259 – 270.

Dobrowolski, S., Harter, M., Stacey, D. W. 1994. Cellular ras activity is required for passage through multiple points of the G0/G1 phase in BALB/c 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* 14 (8): 5441 – 5449.

Downward, J. 1998. Ras signalling and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (1): 49 – 54.

Feig, L. A. and Cooper, G. M. 1988. Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Molecular and Cellular Biology* 8(8): 3235-3243.

Feig, L.A. 1999. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* 1(2): E25-27.

Felsher, D. W., Bishop, J. M. 1999. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol. Cell.* 4 (2): 199 – 207.

Foley, K. P. and Eisenman, R. N. 1999. Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Mxi1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim. Biophys Acta*, 1423 (3): M37 – 47.

Forti, F. L., Schwindt, T. T., Moraes, M. S., Eichler, C. B., Armelin, H. A. 2002. ACTH Promotes p27kip1 Induction in Mouse Y1 Adrenocortical Tumor Cells on both PKA activation and Akt/PKB Inactivation. *Biochemistry*, 41 (31): 10133 – 10140.

Garrington, T. P. and Johnson, G. L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11 (2): 211 – 218.

George, D. L., Scott, ^a F., Martinville, B. and Francke, U. 1984. Amplified DNA in Y1 mouse adrenal tumor cells: isolation of cDNAs complementary to a amplified c-k-ras gene and localization of homologous sequences to mouse chromosome 6. *Nucleic Acids Research*, 12(6): 2731-2743.

Graves, L. M., Guy, H. L., Kozlowski, P., Huang, M., Lazarowski, E., Pope, R. M., Collins, M. A., Dahlstrand, E. N., Earp, H. S. and Evans, D. R. 2000. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature*, 403: 328 – 332.

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

Hann, S. R., Eisenman, R. N. 1984. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol. Cell. Biol.* 4 (11): 2486 – 2497.

Hrycyna, C. A and Clarke, S. 1992. Maturation of isoprenylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae* multiple activities catalyze the cleavage of the three carboxyl-terminal amino acids from farnesylated substrates in vitro. *J. Biol. Chem.* 267 (15): 10457 – 64.

Jones, T. R. and Cole, M. D. 1987. Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences. *Mol. Cell. Biol.* 7 (12): 4513 – 4521.

Kauffmann-Zeh A., Rodriguez-Viciana P., Ulrich E., Gilbert C., Coffey P., Downward J. Evan G. 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*, 385: 544 – 548.

Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., Leder, P. 1983. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35: 603 – 610.

Kimura, E. and Armelin, H. A. 1988. Role of proto-oncogene c-Ki-ras amplification and overexpression in the malignancy of Y-1 adrenocortical tumor cells. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21, 189-201.

King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. and Kirschner, M. W. 1996. *Science* 274: 1652-1659.

Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P. D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J., Hall, A. 1996. Rac and Cdc41 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*, 87 (3): 519 – 529.

Lepique, A P., Forti, F. L., Moraes, M. S., Armelin, H. A. 2000. Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocr. Res.* 26 (4): 825 – 832.

Lotfi, C. F. P., Todorovic, Z., Armelin, H. A. and Schimmer, B. P. 1997. Unmasking a growth promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J. Biol. Chem.* 272: 29886 - 29890.

Lotf, C. F., Lepique, A P., Forti, F. L., Schwindt, T. T., Eichler, C. B., Santos, M. O, Rebustine, I. T., Hajj, G. N., Juliano, L., Armelin, H. A 2000. Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33 (10): 1133 – 1140.

Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. 1993. Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.*: 62: 851 – 891.

Luscher, B., Eisenman, R. N. 1990. New light on Myc and Myb. Part I. *Myc. Genes Dev.* 4: 2025 – 2035.

Luscher, B., Eisenman, R. N. 1990. New light on Myc and Myb. Part II. *Myb. Genes Dev.* 4: 2235 – 2241.

Malumbres, M. and Pellicer, A. 1998. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.* 3: d887 – 912.

Malumbres, M. and Barbacid, M. 2001. To Cycle or Not to Cycle: a Critical Decision in Cancer. *Nature*, 1: 222 – 231.

Masters, S. B., Sullivan, K. A., Miller, R. T., Beiderman, B., Lopez, N. G., Ramachandran, J. and Bourne, H. R. 1988. *Science* 241: 448-451.

Mechta, F., Lallemand, D., Pfarr, C. M. and Yaniv, Moshe. 1997. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* 14: 837 –847.

Minden, A., Lin, A., Claret, F. X., Abo, A., Karin, M. 1995. Selective of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, 81 (7): 1147 – 1157.

Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261 – 291.

Mulcahy, L. S., Smith, M. R., Stacey, D. W. 1985. Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, 313: 241 – 243.

Norbury, C. and Nurse, P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 441-470.

Pardee, A. B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 240: 603-608.

Pardee, A. B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1286 - 1290.

Peeper, D. S., Upton, T. M., Ladha, M. H., Neuman, E., Zalvide, J., Bernards, R., DeCaprio, J.A., Ewen, M. E. 1997. Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature*, 386: 177 – 181.

Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Dhad, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Water, M. D., Downward, J. 1984. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370: 527 – 532.

Rommel C., Clarke, B. A., Zimmermann S., Rossman R., Reid k., Moelling K., Yancopoulos G. D., Glass D. J. 1999. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, 286: 1738 – 1741.

Ryder, K. and Nathans, D. 1988. Induction of proto-oncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8464 – 8467.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual*; 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sassoni-Corsi, P., Ransone, L. J., Lamph, W. W. and Verma, I. 1988. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the "leucine zipper" domain. *Nature* 336: 692 – 695.

Satoh, T., Endo, M., Nakafuku, S., Kaziro, Y. 1990. Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21ras.GTP complex in Swiss mouse 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (15): 5993 – 5997.

Schwab, M., Alitalo, K., Varmus, H. E., Bishop, J. M., George, D. 1983. A cellular oncogene (c-k-ras) is amplified, overexpressed and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumor cells. *Nature* 303, 497-501.

Sears R., Leone, G., DeGregori, J., Nevins, J. R. 1999. Ras Enhances Myc Protein Stability. *Molecular Cell*, 3: 169-179.

Sears, R., Nevins, J. R. 2002. Signaling Networks that Link Cell Proliferation and Cell Fate. *J. B. C. Papers in Press*.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., Nevins, J. R. 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14 (19): 2501 – 2514.

Seger, R. And Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726 – 735.

Sevetson, B. R., Kong, X., Lawrence, J. C., Jr. 1993. Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10305-10309.

Sherr, C. J. 2000. Cancer and cycles revisited. *Cancer Res.* 60: 3689 – 3695.

Spencer, C. A., and Groudine, M. 1991. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.* 56: 1 – 48.

Spotts, G. D., Hann, S. R. 1990. Enhanced translation and increased turnover of c-myc proteins occur during differentiation of murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 10 (8): 3952 – 3964.

Taylor, S. J., Shalloway, D. 1996. Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr. Biol.*, 6 (12): 1621 – 1627.

Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J., Sturgill, T. W. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3' ,5'-monophosphate. *Science*, 262: 1065 – 1069.

Xia, Z., Dickens, J., Raingeaud, J., Davis, R. J., Greenberg, M. E. 1995, Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270: 1326 – 1331.

Yasumura, Y., Buonassissi, Y., Sato, G. 1996. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res.* 26: 529-535.

Zetterberg, A., Larsson, O., Wiman, K. G. 1995. What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology*, 7: 835 - 842.

Zimmermann S. and Moelling K. 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, 286: 1741 – 1744.