UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

EFEITOS DE ACTH, PMA E dcAMP NA EXPRESSÃO DE GENES DAS FAMÍLIAS FOS E JUN E DO GENE C-MYC E NA ATIVIDADE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO AP-1 EM CÉLULAS ADRENOCORTICAIS Y-1

ANA PAULA LEPIQUE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: PROF. HUGO AGUIRRE ARMELIN

SÃO PAULO
1996

"Efeitos de ACTH, PMA e dcAMP na Expressão de Genes das Famílias FOS e JUN do Gene C-MYC e na Atividade do Fator de Transcrição AP-1 em Células Adrenocorticais Y-1"

ANA PAULA LEPIQUE

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.

Aprovado por:

Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto
IQ - USP

Prof. Dr. Antonio Rossi Filho
FFCLRP - USP

SÃO PAULO
04 DE NOVEMBRO DE 1996

À minha filha querida, Alice.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que tiveram participação na realização deste projeto, em especial:

Ao Prof. Hugo Aguirre Armelin, por ter sido de fato um grande professor, pela orientação dedicada, pelos ensinamentos e pela confiança.

À Profª. Dra. Eico Kimura, pela inesquecível presença de todas as horas, pelo incentivo diário e pela amizade.

À Dra. Claudimara Lotfi, minha grande amiga Cau, cuja ajuda profissional foi de grande importância, e que tem sido um modelo de mulher, mãe e profissional para mim. Por tudo o que tem me ensinado, pelo apoio, pelo bom senso, pelas discussões tão ricas sobre ciência e sobre a vida.

À Dra. Karla Kovary, por tantos ensinamentos e pela convivência tão particular.

À Dra. Kátia Rocha, minha querida Ká, por tudo que me ensinou com tanta paciência, por me mostrar uma conduta profissional e perseverante.

À Marcella Faria, amiga tão brilhante, pela convivência tão rica, pela troca de idéias, pelas críticas construtivas e por ter ensinado coisas que nem imagina.

À Claudia Frigeri, que para mim é uma irmã, com todas as diferenças e afinidades, pela torcida, pelo apoio, por ter me ensinado tantas coisas.

À Catarina Myamoto, Cata, por ter me ensinado tantas coisas e me ajudado tantas vezes, e por ser uma pessoa tão singular e tão querida.

Ao Eduardo Purgatto, pelo apoio técnico e informático. Mas principalmente por ter sido sempre tão amigo, pelo incentivo, pelas injeções de ânimo de manhã cedo, pela convivência tão fácil e tão divertida.

Aos novos colegas do laboratório, Cláudia Eichler, Fábio Forti e Telma Schwindt pelo trabalho conjunto, pelas discussões produtivas e pela convivência tranquila.

Aos amigos Pio Zapella, Adriana Capella, Plínio Cristofolleti, Edilaine Linares, Reynaldo Gatti e Jolie Kwee pela convivência feliz e tranqüila e pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Angêlo Gambarini e seu grupo, pela amizade e pela troca de idéias.

Ao Dr. Paulo Lee Ho, por ser um modelo de profissional e pela amizade.

À Profª. Dra. Mari Armelin, pelo apoio científico e ao pessoal do seu laboratório pelo compartilhamento de idéias e conhecimentos.

À Dna. Joana Criscuolo, pelo suporte técnico e pela doçura e amizade de todos os dias.

À Roseli Mendonça, pelo suporte técnico.

Às meninas da sessão de pós-graduação pela ajuda, paciência e disposição.

Ao pessoal do laboratório da Profa. Beatriz, principalmente à Isaura, e do laboratório da Profa. Sylvia, prinicipalmente o Maurício, por cederem horários para a utilização do densitômetro.

Aos amigos Alessandra Takatu, Fernando Serson, César Rua, Melina, Ronaldo Salomão, Henri, pela amizade tão concreta, às vezes distante, mas cuja existência foi e sempre será muito importante.

À Maria Aparecida Juliano por ser uma grande amiga, companheira em várias horas, pelos momentos divertidos e descontraídos, pelos almoços nos domingos, pela cumplicidade de termos a mesma profissão e falarmos a mesma 'língua".

Maria de Lourdes Ferreira, Dadá, pelo café, pelo "PF", pelo bate-papo furado, e pela ajuda tão espontânea e tão necessária.

À Maysa e Cynthia, minhas irmãs, que apesar de mais novas estão sempre me dando lições sobre a vida e mostrando ângulos diferentes do mundo.

À Má, em especial, por estar sempre por perto para um abraço sincero e amigo, para poder falar dos sentimentos, dos medos e das alegrias.

Ao Prof. Luiz Juliano, um professor excepcional, pela sua maneira tão extraordinária de ensinar tantas coisas sobre a ciência e sobre a vida. Pelo apoio e ajuda.

À Jean Juliano, pelo apoio, pelo carinho, pelo cuidado, pelas lições sobre a vida e sobre viver.

Aos meus pais, Luiza e Carlos por terem me ensinado a lutar pelo que quero, mais importante ainda, que sempre vale a pena lutar, pelo apoio, amor e cuidado, pela presença tão diária e pela certeza de que estão sempre lá.

Aos meus avós, Maria Luiza e Duarte, pela ajuda em todos os momentos críticos, pelo carinho, pela participação na minha formação pessoal e profissional e pelo amor dedicado.

A uma das pessoas mais especiais que eu já conheci, pelo amor, pelo carinho, pelo abraço apertado, a querida e inesquecível Dorina Juliano.

Ao meu querido André, pelo apoio, pelas injeções de ânimo, pelo almoço, pelo chocolate, pelas madrugadas afora fazendo compania no laboratório, pela paginação desta tese e por tantas outras coisas, mas principal e fundamentalmente pelo amor incondicional.

Este projeto foi financiado pelo CNPq e pela FAPESP. A bolsa de Mestrado a mim concedida também foi financiada pela FAPESP.

Índice

Índice 1

Abreviaturas 3

Resumo 5

Summary 6

I. Introdução 7

O Ciclo Celular em Mamíferos 8
Transição G0→G1→S 9
Fatores que promovem a transição G0→G1→S 9
Algumas vias de transdução de sinal 10
Genes Envolvidos e Controle de Transcrição 12
As famílias fos e jun e o complexo AP-1 13
O Proto-oncogene c-myc 15
Expressão Gênica 16
Transcrição gênica 17
Degradação de mRNA em eucariotos 18
Y-1, um modelo para estudo da ação mitogênica de ACTH 19
ACTH 19
A Linhagem Y-1 20
Como ACTH regula a proliferação em Y-1 20
A Expressão de Fos e Jun em Y-1 21
ACTH inibe a expressão de c-myc 22
O Controle de Expressão Gênica X Proliferação 22
O Mecanismo de Ação de ACTH Envolve Outra Via que não é PKA 23

II. Objetivos 26

III. Materiais e Métodos 29

Materiais 30
Linhagem Y-1 30
Bactérias 30
Plasmídeos 30
Drogas 31
Isótopos radioativos 32
Enzimas 32
Oligonucleotídeos 32
Métodos 33
Cultura de Células 33
Manipulação de Bactérias 34
Obtenção de bactérias competentes 34
Transformação de bactérias competentes 34
Preparação de plasmídeos em pequena, média e larga escala 34
Ensaio de dose-resposta a ActinomicinaD 35
Ensaio de retardamento de oligonucleotídeo em gel - Medida da atividade de AP-1 36
Preparação de extratos nucleares 36

Reação de ligação a DNA e eletroforese em gel de poliacrilamida..... 38
Marcação de oligonucleotídeo 39
Ensaio de Elongação de Cadeia Nascente de RNA - Cinética de transcrição de fos, jun e c-myc..... 40
Isolamento de núcleos..... 40
Preparação das membranas com o DNA fixado ("Slot blot")..... 42
Reação de elongação das cadeias nascentes de RNA..... 42
Extração e purificação do RNA nuclear 43
Pré-hibridização, hibridização, lavagem e exposição das membranas 43
Ensaios de Northern Blot - Medida da meia-vida dos mRNAs fos e jun .. 44
Extração de RNA total 44
Fracionamento de RNA em gel de agarose / formaldeído..... 45
Pré-hibridização, hibridização, lavagem das membranas e exposição 46
Preparação de sondas radioativas..... 47
Densitometria 47
Cinética de transcrição de fos, jun e c-myc..... 47
Ensaio de atividade de AP-1 48
Tratamento estatístico dos dados..... 49
Ensaio de Elongação de Cadeia Nascente de RNA..... 49
IV. Resultados 50
Ensaio de atividade de AP-1 em células Y-1 51
Transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1..... 59
Níveis de mRNA dos proto-oncogenes fos e jun em células Y-1 carenciadas, detectados por hibridizações tipo Northern 72
V. Discussão..... 78
Atividade de AP-1 em células Y-1 79
Cinética de indução da transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1 81
A regulação de c-myc..... 82
Regulação dos níveis dos mRNAs dos proto-oncogenes fos e jun 82
IV. Conclusões..... 84
VII. Referências Bibliográficas 86
Curriculum Vitae 98
Dados Pessoais 99
Educação 99
2° grau 99
3° grau 99
Pós-graduação 99
Ocupação..... 99
Publicação..... 99

Abreviaturas

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico

AP-1 - Activator Protein-1

ATP - Trifosfato Adenosina

cAMP - Monofosfato de Adenosina cíclico

cdk - cyclin dependent kinase

CRE - cAMP Responsive Element

CREB - cAMP Responsive Element Binding Protein

CREB/ATF - CRE Binding Protein/Activated Transcription factor

CTP - Trifosfato Citosina

dATP - Trifosfato desoxiadenosina

dcAMP - dibutiril cAMP

dCTP - Trifosfato desoxicitosina

dGTP - Trifosfato desoxiguanosina

DME - Dubelco's Modified Eagle Medium

DTT - Ditiotreitol

dTTP - Trifosfato desoxitimidina

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetraacético

EGF - Epidermal Growth Factor

FCS - Fetal Calf Serum

FGF - Fibroblast Growth Factor

GAPDH - Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GDP - Difosfato Guanosina

GTP - Trifosfato Guanosina

GM-CSF - Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

HLH/LZ - Helix-Loop-Helix/Leucine Ziper

IGF - Insulin-like Growth Factor

MAPK - Mitogenic Activated Protein Kinase

NGF - Nerve Growth Factor

PDGF- Plateled Derived Growth Factor

PKA - Protein Kinase A, Proteína Quinase A

PKC - Protein Kinase C, Proteína Quinase C

PMA - Phorbol-12 Myristate-13 Acetate

PMSF - Fenilmetano Sulfonil Fluoreto

SDS - Duodecil Sulfato de Sódio

TAFs - TBP Associated Factors

TBE - Tris-Borato-EDTA

TBP - TATA Binding Protein

TCA - Ácido Tricloro Acético

TF - Transcription Factors

TGF - Tumor Growth Factor

TPA - 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate

TRE - TPA Responsive Element

TTP - Trifosfato Timidina

UTP - Trifosfato Uridina

Resumo

As células Y-1 pertencem a uma linhagem clonal de células funcionais de córtex adrenal de camundongo, que respondem a ACTH.

Em células Y-1, ACTH promove a esteroidogênese (função) e tem efeitos regulatórios complexos na transição G0→G1→S do ciclo celular. ACTH promove a transição G0→G1, mas inibe a transição G1→S. É possível que a regulação do ciclo celular por ACTH seja mediada pelo controle da expressão dos proto-oncogenes das famílias fos, jun e myc. Nosso laboratório mostrou, anteriormente, que ACTH induz a expressão dos genes fos e jun, mas inibe c-myc.

O objetivo deste trabalho foi identificar pontos de controle na expressão dos genes fos, jun e myc e na atividade dos fatores de transcrição AP-1 (dímeros da proteínas Fos e Jun) por ACTH, derivados de cAMP (ativadores de PKA), PMA (ativador de PKC) e FCS (soro fetal bovino).

ACTH, PMA e dcAMP aumentam a atividade de ligação de AP-1 a DNA, independentemente de síntese protéica.

Ensaios de elongação de cadeia nascente de RNA (run off transcription) mostram que ACTH, PMA e FCS são fortes indutores de c-fos, c-jun e junB, enquanto dcAMP induz apenas c-fos e junB.

Hibridizações Northern permitiram estimar a meia-vida dos mRNAs de c-fos e c-jun em 30 min, independentemente do tratamento com ACTH ou PMA. Diferentemente de c-fos, o mRNA de fosB é superinduzido por ActinomicinaD em células Y-1 tratadas com ACTH e PMA.

Summary

The Y-1 cells belong to a clonal lineage of functional mouse adrenocortical cells, which are responsive to ACTH.

In Y-1 cells, ACTH promotes esteroidogenesis (function) and has complex effects on the G0→G1→S transition of the Y-1 cell cycle. ACTH induces the G0→G1 transition but inhibits the G1→S transition. Probably, the cell cycle regulation by ACTH is mediated by the expression control of the proto-oncogenes from the fos, jun and myc families. Our laboratory has previously shown that ACTH induces the fos and jun genes expression, but inhibits c-myc expression.

The target of this work was to identify control points in the fos, jun and myc genes expression and in the AP-1 transcription factors (Fos and Jun proteins dimers) by ACTH, cAMP derivatives (PKA activators), PMA (PKC activator) and FCS (Fetal Calf Serum).

ACTH, PMA and dcAMP raise the AP-1 DNA binding activity, independently of protein synthesis.

Run off transcription assays show that ACTH, PMA and FCS are strong c-fos, c-jun and junB inducers, while dcAMP induces only c-fos and junB.

Northern hybridisations allowed us to estimate the half life of the fos and jun mRNAs in about 30 min, independently of ACTH or PMA treatment. Differently of c-fos, fosB mRNA is superinduced by ActinomicinD treatment in Y-1 cells treated with ACTH or PMA.

I. Introdução

O Ciclo Celular em Mamíferos

A divisão celular implica na duplicação do DNA genômico, que ao contrário do que se pensava há cerca de 40 anos, ocorre durante uma fase discreta do ciclo celular. O ciclo celular mitótico foi dividido em fases com base em experimentos do tipo "pulso e caça", onde um pulso de precursor de DNA, radioativamente marcado, é fornecido a uma cultura de células e, após um período determinado, analisa-se a quantidade de precursor incorporado, por autorradiografia em função de tempo (Quastler & Sherman, 1959). As fases do ciclo celular são:

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

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

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

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

Existem dois pontos durante o ciclo celular em que decisões quanto a progressão pelo ciclo tem que ser tomadas, um deles, chamado ponto de restrição, ocorre em G1, quando a célula se "compromete" a replicar o DNA genômico, isto quer dizer que mesmo que o estímulo para a replicação seja retirado, a célula continua o ciclo até replicar o DNA, as condições testadas são massa celular, estado nutricional do meio, síntese de proteínas (Pardee, 1974). O outro ocorre em G2, onde a célula tem a possibilidade de verificar se o DNA foi completamente duplicado, se não existem danos, se a massa celular está adequada. O ponto de controle mais importante é o que ocorre em G1, a célula passa a maior parte do tempo nesta fase e a duração de G1 é ajustada pelas condições de crescimento. Se a célula passar sequencialmente por todas as etapas necessárias em G1, então ela entrará em S.

Nos tecidos de mamíferos encontramos células em diferentes estágios de replicação ou em diferentes fases do ciclo celular. Células embrionárias ou de tecidos em proliferação, que terminam a mitose de um ciclo e entram diretamente na fase G1 de outro ciclo, sendo que muitas vezes a fase G1 destas células é mais curta que o normal. Algumas células dividem-se apenas uma vez e depois morrem. Há ainda o caso de células que têm competência para dividirem-se mas não o fazem por falta de estímulo apropriado, este é o caso da maior parte das células de um organismo adulto, que se encontram quiescentes, na chamada fase G0.

Células normais mantidas em cultura correspondem ao último caso, ou seja, quando estimuladas por fatores de crescimento entram no ciclo celular e na falta destes entram em G0 ou ficam quiescentes.

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

Transição G0→G1→S

Fatores que promovem a transição G0→G1→S

São basicamente os fatores de crescimento e hormônios clássicos, como por exemplo, os hormônios tróficos.

Entre os fatores de crescimento mais conhecidos estão: PDGF (Plateled Derived Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor) TGF (Transforming Growth Factor), GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), NGF (Nerve Growth Factor).

Os fatores de crescimento são peptídeos que têm ação parácrina ou autócrina, são secretados por células, possuem papel fundamental na comunicação entre órgãos ou entre células do mesmo tecido.

O hormônio trófico mais conhecido é o hormônio de crescimento, também peptídico, mas outros hormônios exercem função de crescimento tecido-específica, além de desempenharem outras funções, é o caso da adrenocorticotropina, um peptídeo secretado pela hipófise que age especificamente no córtex adrenal, induzindo secreção de hormônios esteróides e sendo responsável pelo crescimento e manutenção do tecido.

O mecanismo de ação destes fatores (incluindo os hormônios citados) envolve reconhecimento e ligação a um receptor transmembranar. Entre os receptores transmembranares 2 tipos principais estão envolvidos na sinalização destes fatores. Receptores com domínios tirosina quinase, que normalmente mediam a resposta a fatores de crescimento, com uma cadeia polipeptídica que cruza a membrana uma vez. São proteínas que uma vez ligadas ao fator de crescimento ou hormônio dimerizam-se e se autofosforilam, estes eventos promovem alteração de conformação que ativa o domínio de tirosina quinase, exemplos de receptores tirosina quinase são os receptores de PDGF e EGF. Outro tipo de receptor é o de 7 hélices, normalmente reconhecido por hormônios peptídicos, que cruza a membrana 7 vezes apresentando alças na parte externa da célula e no citoplasma e que ativa proteína G. Estes receptores são capazes de ativar ou inibir vias de transdução de sinal, alterando o fenótipo da célula, através do controle da expressão diferencial de genes.

Algumas vias de transdução de sinal

Uma via de transdução de sinal importante é a via clássica ativada por proteína G.

Proteínas G são formadas por três subunidades, a subunidade α tem atividade de hidrólise de GTP em GDP, quando ligada a GTP, dissocia-se das subunidades β e γ e liga-se à adenilato ciclase, por exemplo, ativando-a. O dímero $\beta\gamma$ também é capaz de ativar outras enzimas, por exemplo a

fosfolipase A2 e fosfolipase C (Inglese et al, 1995). Diferentes proteínas G podem ligar-se a diferentes alvos, ativando diferentes vias.

Adenilato ciclase é um dos efetores ativados por proteína G, esta enzima é capaz de, quando ativada, hidrolisar ATP em AMP cíclico. cAMP, juntamente com Ca^{+2} foram os primeiros segundos mensageiros celulares conhecidos. cAMP ativa a enzima PKA (Protein Kinase A ou Proteína Quinase dependente de cAMP). Esta enzima é composta por 4 subunidades, 2 regulatórias e 2 catalíticas, as regulatórias são ativadas por cAMP. Quando cAMP liga-se às subunidades regulatórias de PKA, estas liberam as subunidades catalíticas que têm atividade de proteína quinase. PKA regula uma série de processos celulares, entre eles o metabolismo do glicogênio, através da fosforilação da glicogênio sintase e transcrição gênica através da fosforilação de CREB (CRE Binding Protein). CREB é um fator de transcrição que reconhece elementos responsivos a cAMP (CRE) em promotores de vários genes, por exemplo o da somatostatina (Yamamoto et al, 1988), o da gonadotrofina coriônica (Delegeane et al, 1987) e o de c-fos (Sassoni-Corsi et al, 1988).

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

Outra importante via ativada por proteínas G é a via de PKC (Protein Kinase C ou Proteína Quinase dependente de Ca^{+2}) (Nishizuka, 1984). PKC é uma quinase dependente de Ca^{+2} e fosfolípides e ativada por diacilglicerol. É composta por um domínio catalítico, cuja atividade é de serina/treonina quinase e um domínio regulatório, que mantém a parte catalítica da cadeia inativa. Ca^{+2} e diacilglicerol são gerados transitoriamente na célula através da ativação da fosfolipase C. Esta enzima tem papel fundamental na sinalização celular, pois uma vez ativada, hidrolisa fosfatidil inositol 4,5 bifosfato em diacilglicerol e inositol trifosfato, este último promove abertura de canais de Ca^{+2} do retículo endoplasmático aumentando a concentração de Ca^{+2} citossólica. O aumento de Ca^{+2} e diacilglicerol ativam PKC, que é translocada para a membrana (considerada ativa apenas quando ligada à membrana). Diacilglicerol interage com o domínio regulatório de PKC revertendo o efeito

inibitório deste sobre o domínio catalítico. PKC é capaz de ativar outras quinases que regulam a expressão gênica (Nishizuka, 1992).

Uma classe especial de proteínas G, descobertas mais recentemente, são as "small G proteins", que também têm atividade de hidrólise de GTP, mas são constituídas de uma única cadeia polipeptídica. Uma delas é Ras, com papel central em vias de transdução de sinal ativadas por fatores de crescimento, envolvida em vários tipos de processos tumorais (Bishop, 1983). As proteínas Ras, também conhecidas por $p21^{ras}$, são ativadas pelo seguinte sistema: um receptor do tipo tirosina quinase é ativado por um fator de crescimento, e a proteína Grb2 liga-se ao receptor através do seu domínio SH2 e à proteína Sos através de seu domínio SH3, Sos promove então a troca de GDP por GPT em Ras ativando-a. Ras ativada promove fosforilação de Raf. E Raf por sua vez fosforila a primeira enzima da cascata de quinases conhecidas como MAP quinases. A cascata termina no núcleo onde a última quinase fosforila fatores de transcrição ou a quinase Rsk que também fosforila fatores de transcrição (Sun & Tonks, 1994; McCormick, 1993; Feig, 1993). Os fatores de transcrição ativados por fosforilação em resíduos de serina promovem a transcrição de uma série de genes chamados gene de resposta primária, cuja indução independe de síntese de proteínas.

Genes Envolvidos e Controle de Transcrição

Quando uma célula quiescente passa de G0 para G1, há indução de transcrição de vários genes. A primeira onda de transcrição é constituída dos chamados genes de resposta primária, que é independente de síntese proteica. Parte dos produtos dos genes de resposta primária são fatores de transcrição que provocam uma nova onda de transcrição gênica, dos chamados genes de resposta secundária.

Entre os genes de resposta primária, estão diversos conhecidos como proto-oncogenes, cujos produtos são fatores de transcrição. São classificados como proto-oncogenes porque alterações como mutação, amplificação ou translocação destes genes, que causam super expressão, podem levar à perda do controle do ciclo celular provocando neoplasias e tumores.

Acredita-se atualmente que o controle da transição G0→G1→S é determinado por mecanismos de regulação de transcrição gênica. Esta proposição está de acordo com a constatação experimental de que entre os genes de resposta primária, cuja indução é necessária para a transição G0→G1, estão proto-oncogenes, que codificam fatores de transcrição.

Há, no entanto, uma outra categoria de genes, cujos produtos participam do controle de transcrição e que regulam a progressão através de G1. Estes genes são conhecidos como anti-oncogenes ou genes supressores de tumor, porque a sua inativação propicia a transformação celular e a tumorogênese. Neste grupo de genes estão p53 e pRb.

As famílias fos e jun e o complexo AP-1

Entre os proto-oncogenes mais conhecidos estão os proto-oncogenes das famílias fos e jun. Estes proto-oncogenes são genes de resposta primária, cuja expressão é induzida transientemente por vários fatores de crescimento, além de soro e ésteres de forbol (Bravo et al, 1986; Cochran et al, 1984; Greenberg & Ziff, 1984; Lamph et al, 1988; Ryseck et al, 1988; Ryder & Nathans, 1988). A família fos compreende os proto-oncogenes c-fos, fosB, fra-1 e fra-2, enquanto que a família jun compreende os proto-oncogenes c-jun, junB e JunD. Em células 3T3 carenciadas, não se observa a expressão destes genes, porém estimulação com soro ou fatores de crescimento provocam indução transitória da expressão dos mRNAs e das proteínas destes genes, com perfis cinéticos característicos (Bravo et al, 1987). Ensaios de microinjeção de anticorpos contra as proteínas c-Fos e c-Jun, assim como a utilização de oligonucleotídeos antisense bloqueiam a progressão do ciclo celular (Kovary & Bravo, 1991; Nishikura & Murray, 1987; Holt et al, 1988; Cosenza et al, 1994).

As proteínas Fos e Jun têm ação como fatores de transcrição do tipo zíper de leucina (Sassone-Corsi et al, 1988; Curran & Franza, 1988). As proteínas codificadas por estes genes possuem um domínio zíper de leucina, sendo capazes de formar dímeros, possuem também domínio de ligação a DNA, domínios de transativação e domínio de interação com proteínas do

complexo de transcrição basal. As proteínas Jun são capazes de formar homodímeros, em qualquer combinação Jun/Jun e também heterodímeros com as proteínas fos em qualquer combinação Jun/Fos. Há portanto, um grande número de complexos possíveis de serem formados, este grupo de fatores de transcrição é chamado AP-1 (Activator Protein - 1), tendo ação transativadora em promotores de vários genes. (Chiu et al, 1988).

AP-1 foi originalmente descoberto em células humanas como uma proteína que se liga, seletivamente, a elementos "enhancer" na região cis de controle do vírus SV-40, do gene da metalotioneína humana e de vários outros genes de vertebrados (Lee et al, 1987; Angel et al, 1987). AP-1 também está presente nas regiões de controle de genes estimulados em células tratadas com ésteres de forbol (Angel et al, 1987; Lee et al, 1987). Inicialmente acreditava-se que AP-1 fosse um fator de transcrição único, verificando-se posteriormente que se tratava de dímeros das proteínas citadas acima.

O fator AP-1 liga-se, no DNA, a regiões responsivas a TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate), conhecidas como TRE (TPA Responsive Element). A seqüência consenso a que AP-1 liga-se é 5'TGA G/C TCA3' (Curran & Franza, 1988).

Ensaios de ligação a oligonucleotídeos mostram que diferentes dímeros têm diferentes afinidades por esta sequência (Ryseck & Bravo, 1991). Alterações nesta sequência e diferenças nas regiões flanqueadoras desta também alteram a afinidade dos dímeros AP-1 pelo DNA alvo, assim diferentes promotores podem ser reconhecidos preferencialmente por tipos específicos de dímeros. Outra informação importante é que estas proteínas podem interagir com outros fatores de transcrição e Jun pode formar dímeros com outras proteínas, por exemplo CREB, o fator de transcrição ativado pela via cAMP-PKA que reconhece a sequência consenso TGACGTCA (Dorsey et al, 1995; Kataoka et al, 1995).

A atividade dos complexos AP-1 pode ser regulada em vários níveis: transcrição, estabilidade do mRNA, tradução, estabilidade da proteína e alterações pós-traducionais da proteína, por exemplo fosforilação, constituindo enquanto fator de transcrição, uma ferramenta versátil para a célula regular a expressão de diferentes genes em diferentes situações.

O Proto-oncogene c-myc

c-myc é outro proto-oncogene importante na transição G0→G1→S, c-myc é expresso em células estimuladas para entrada em G1 e os níveis do mRNA e da proteína são mantidos durante G1. Em 1987, Heikkila demonstrou que a expressão de c-myc é necessária para o progresso de G1, uma vez que a utilização de oligonucleotídeo "antisense" contra mRNA de c-myc bloqueia o ciclo celular.

A proteína c-Myc age como fator de transcrição quando dimerizada com a proteína Max. Estas proteínas são classificadas como fatores de transcrição HLH/LZ, isto devido ao fato de apresentarem estes 2 tipos de domínios para dimerização "Helix-Loop-Helix" e zíper de leucina, além destes domínios estas proteínas apresentam um domínio de ligação a DNA e um domínio transativador na região N terminal. O dímero c-Myc/Max reconhece a sequência consenso CAC(G/A)TG (Blackwell et al, 1990; Blackwood & Eisenman, 1991; Kerkhoff et al, 1991; Prendergast et al, 1991; Prendergasf & Ziff, 1991; Blackwood et al, 1992) no promotor de vários genes, alguns já definidos, por exemplo os genes para ornitina descarboxilase e α-protimosina, ambos codificam proteínas importantes para a progressão do ciclo celular. (Eilers et al, 1991; Benvenisty et al, 1992; Bello-Fernandez et al, 1993; Reisman et al, 1993; Wagner et al, 1993; Gaubatz et al, 1994, 1995; Desbarats et al, 1996).

Recentemente, evidências têm se acumulado mostrando que c-myc está envolvido no controle da expressão de ciclina D1 (Phillip et al, 1994; Daksis et al,1994; Marphin et al, 1996). Os experimentos utilizam construções para expressão exógena de c-myc ou um modelo de fibroblastos de rato, Rat-1, transfectados permanentemente com uma quimera de c-myc e receptor de estrógeno, onde c-Myc é ativo apenas quando a célula é tratada com estrógeno ou derivados (Eilers et al, 1989). Nestes experimentos demonstrou-se que expressão transiente de c-myc induz expressão de ciclina D1, enquanto que expressão constitutiva de c-myc em níveis altos (aproximadamente 10 vezes mais mRNA que um fibroblasto normal induzido

por soro) promove inibição da expressão de ciclina D1 e normalmente leva a célula à morte, através de apoptose. De fato, o promotor do gene de ciclina D1 apresenta 3 sequências consenso de ligação de Myc/Max (Daksis et al) e demonstrou-se que a regulação de ciclina D1 por myc ocorre a nível de transcrição.

Por que o controle de ciclina D1 é importante? As ciclinas são proteínas que funcionam em dímeros com quinases dependentes de ciclinas (cdk), sendo a ciclina a subunidade regulatória e a cdk a subunidade catalítica (Sherr, 1994; Sherr, 1995). O dímero tem a atividade regulada por outras proteínas, podendo formar tetrâmeros, esta regulação ocorre a nível de fosforilação em resíduos específicos de serina e treonina, não só a ciclina é fosforilada como também tem atividade de quinase sobre a respectiva cdk (Solomon, 1994). As ciclinas tem expressão ciclo dependente, ou seja são expressas em fases definidas do ciclo celular, sendo que cada fase apresenta ciclinas características, no caso as de G1 são: ciclinas D1, D2 e D3 e ciclina E. As ciclinas D associam-se com cdk4 e cdk6, enquanto que ciclina E associa-se com cdk2.

O gene da ciclina D1 é expresso no início de G1, porém sua proteína tem atividade a partir da metade de G1, quando forma complexos com cdk 2 ou cdk4, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) e p21. Ciclina D1 juntamente com uma de suas cdks é a responsável pelo início da fosforilação de pRb, inativando-o. A inativação de pRb é fundamental para a progressão do ciclo celular pois pRb age como um seqüestrador de fatores de transcrição como E2F (Weinberg, 1995), e de outras proteínas importantes para a progressão do ciclo celular. Por exemplo, é necessário que pRb seja fosforilado para que ciclina E seja expressa (Geng et al, 1996); a expressão de ciclina E no fim de G1 é necessária para que a célula entre em S.

Expressão Gênica

Quando falamos em expressão gênica normalmente estamos pensando na transmissão da informação genética do DNA à proteína.

Intermediariamente, está a população de RNA presente na célula que se encontra em equilíbrio entre transcrição e degradação.

Transcrição gênica

Abordaremos a questão do mecanismo da transcrição propriamente dito, particularmente o sistema que envolve a transcrição de RNA mensageiro, para que possamos discutir posteriormente os efeitos observados e relacioná-los com as informações fornecidas na Introdução.

Em eucariotos, praticamente todos os genes cujos produtos são mRNAs apresentam a sequência consenso conhecida como TATA box em seus promotores. Esta região normalmente encontra-se na posição -25 em relação ao ponto de início da transcrição e serve para orientar o posicionamento do complexo transcricional basal.

Para que se inicie a transcrição é necessário que os fatores basais reconheçam e se liguem ao promotor e que as hélices do DNA sejam separadas. O complexo de transcrição basal é composto pela holoenzima RNA Polimerase II e fatores ligados a ela. Há vários fatores de transcrição que associam-se a esta holoenzima modulando a sua atividade. Alguns fatores são fundamentais, TFIID, que compreende TBP (TATA Binding Protein) com os TAFs associados (TBP Associated Factors) que reconhecem o sítio TATA, TBPs complexados com diferentes TAFs podem reconhecer promotores diferentes.

Outros fatores associam-se ao TFIID, a associação deve seguir uma ordem correta, porém não está definido se as enzimas ligam-se seqüencialmente às que já estão interagindo com DNA ou se existem complexos ordenados já formados que se ligam ao DNA. Os fatores que se associam ao complexo TFIID são: TFIIA, TFIIB, TFIIF com a RNA Polimerase II, TFIIE, TFIIH e TFIIJ. TFIIH parece ser o responsável pela fosforilação do domínio C terminal da polimerase II (CDT), cuja função é romper a interação de CDT com TBP para que comece a transcrição (Drapkin & Reinberg, 1994; Koleske & Young, 1995). Já o fator TFIIF tem papel na separação das hélices do DNA, este fator é composto por 2 subunidades, a maior, RAP74, tem

atividade de helicase dependente de ATP, sendo a enzima que promove a abertura da dupla hélice.

A transcrição de um determinado gene é regulada, não só por fatores basais, mas é também regulada por proteínas que reconhecem elementos distantes do início de transcrição, elementos "enhancer". Estes elementos são reconhecidos por fatores de transcrição, que não são fundamentais para que a transcrição ocorra, mas são capazes de modular a atividade do complexo basal, por exemplo AP-1. O mecanismo de ação deste fatores envolve a ligação a um elemento (sequência consenso no DNA) específico, alterações na cromatina, desestabilizando nucleossomos e estabilizando a ligação de TFIID ao DNA. Estes fatores interagem tanto com a holoenzima RNA polimerase II, quanto com TFIID, aumentando a eficiência do início de transcrição, inclusive permitindo rápida reiniciação, ou inibindo o início de transcrição (Struhl, 1996).

Degradação de mRNA em eucariotos

A degradação de mRNA em eucariotos têm sido objeto de estudo de vários grupos (Shyu et al, 1991; Schiavi et al, 1992; Decker & Parker, 1994; Beelman & Parker, 1995; Chen & Shyu, 1995). Atualmente está descrito o mecanismo de degradação de mRNA em eucariotos, principalmente de mRNAs rapidamente degradados, produtos de genes com papel regulatório, por exemplo proto-oncogenes.

A degradação de um transcrito pode ser dependente ou independente de degradação da cauda de poliA. No caso de degradação dependente de deadenilação o primeiro evento é a digestão de parte da cauda de poli(A) do transcrito, para 25 a 60 resíduos de adenosina, seguido a este passo há a perda da extremidade 5' do transcrito, este transcrito pode ser então degradado rapidamente por digestão 3'→5' ou 5'→3'. Transcritos que não precisam ser deadenilados para serem degradados normalmente são atacados por endonucleases que clivam toda a extremidade 3' do transcrito, podendo este então perder também a extremidade 5' ou ser degradado diretamente por exonucleases com atividade 3'→5' e 5'→3'. De fato, autores

discutem se a clivagem da extremidade 3' não equivale à perda da cauda de poli(A). A hipótese destes grupos é que há uma interação entre as extremidades 3' e 5' do transcrito e que esta interação protege o transcrito contra degradação seja por impedimento estérico do acesso de nucleases, seja por proteger o início de tradução, o que também impede a degradação do mRNA.

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

ACTH

ACTH, hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina, é um hormônio peptídico de 39 aminoácidos, produto da clivagem da proteína pro-opiomelacortina (POMC), que é secretada pela hipófise na corrente sanguínea em resposta ao fator liberador de corticotrofina (CRF). O alvo de ACTH são as células do córtex das glândulas adrenais.

A secreção de ACTH é controlada pelas vias dopaminérgica e serotoninérgica, sendo que os corticosteróides produzidos em resposta ao estímulo de ACTH retroalimentam negativamente a via de secreção do hormônio (Dallman et al, 1987).

Os principais efeitos de ACTH sobre as glândulas adrenais são indução da síntese e secreção de hormônios esteróides e manutenção e crescimento do córtex adrenal.

O receptor de ACTH só foi clonado e sequenciado em 1992 por Levis e colaboradores, revelando um receptor com 7 hélices transmembranares que se associa a proteína G (Mountjoy et al, 1992). O receptor de ACTH apresenta na sua estrutura primária sequências de fosforilação por PKA, PKC e caseína quinase II.

A Linhagem Y-1

As células Y-1 foram isoladas de tumor de córtex adrenal de camundongo, (Yasumura et al, 1966). Apesar de tumorigênicas, estas célula mantém as principais características do córtex adrenal, respondendo a tratamento com ACTH sintetizando e secretando esteróides. Por terem mantido características do córtex adrenal e por ser uma linhagem bem estabelecida em cultura estas células têm sido utilizadas como modelo para os mecanismos de estudo de ACTH (Schimmer, 1981).

Células Y-1 tratadas com ACTH apresentam as seguintes respostas: arredondamento celular, síntese e secreção de hormônios esteróides, indução ou bloqueio de proliferação dependendo do tempo de tratamento, indução da expressão dos proto-oncogenes fos e jun e bloqueio da expressão do proto-oncogene c-myc (Yasumura et al, 1966; Armelin et al 1977, Wiedman & Gill, 1977; Kimura et al, 1983; Kimura & Armelin, 1988; Kimura et al, 1993a). Schimmer e colaboradores mostraram através da utilização de mutantes PKA^-, que parte destas respostas é independente de síntese de RNA, mas dependente de síntese de proteína e que a via adenilato ciclase - cAMP - PKA é obrigatória na sinalização para síntese de hormônios esteróides em Y-1 (Garren et al, 1971; Rae et al, 1979).

Como ACTH regula a proliferação em Y-1

Como citado acima ACTH pode induzir ou bloquear proliferação segundo o período de tratamento em células Y-1. É amplamente comprovado e aceito o fato de ACTH bloquear o ciclo celular em G1 em células Y-1 (Weidman & Gill, 1977; Kimura et al, 1993b).

As células Y-1 apresentam o proto-oncogene c-Ki-ras amplificado com 50 a 80 cópias por célula, há alto nível de expressão do mRNA e da proteína deste gene, 10 a 20 vezes mais que um fibroblasto normal, assim como alta atividade da proteína, 16% da proteína c-Ki-Ras total apresenta-se

constantemente na forma ligada a GTP, portanto ativa (Armelin et al, 1996). Aparentemente a amplificação de c-Ki-Ras é necessária para a manutenção do estado malígno de Y-1 (Kimura et al, 1988).

Apesar de transformadas, as células Y-1 podem ser carenciadas em meio de cultura sem adição de soro ou fatores de crescimento, 80 a 90% da população destas células sofrem bloqueio reversível do ciclo celular, isto é, quando estimuladas com soro entram novamente no ciclo celular, sendo que a porcentagem da população que entra em S é proporcional à concentração de soro utilizado (Armelin et al, 1996).

ACTH é capaz de induzir células carenciadas a entrar em S, se fornecido às células em pulso de 2h. Esta indução é tão eficiente quanto a observada em células nas mesmas condições tratadas com soro por 2h, mostrando que ACTH tem ação mitogênica sobre células Y-1, em tratamentos curtos. Tratamento por 4h ou mais, promovem bloqueio do ciclo celular em G1 (Armelin et al, 1996). Células Y-1 em crescimento exponencial tratadas com ACTH bloqueiam a síntese de DNA após um período de 4h (Armelin et al, 1977; Kimura et al, 1983; & 1993b).

A Expressão de Fos e Jun em Y-1

A princípio acreditava-se que todo o mecanismo de ação de ACTH fosse independente de transcrição gênica, em 1988 Simpson e Waterman mostraram que ACTH regula a transcrição das enzimas da via esteroidogênica. Outros grupos demonstraram que ACTH é capaz de regular expressão gênica (Moore & Miller, 1991) e não apenas das enzimas da via esteroidogênica (Viard et al, 1993). Os trabalhos de Kimura e colaboradores (Kimura et al, 1988, 1990 & 1993a) mostram que células Y-1 em crescimento exponencial apresentam indução da expressão dos mRNAs e proteínas das famílias fos e jun quando tratadas com ACTH. Os perfis cinéticos de indução da expressão dos mRNAs são os seguintes: c-fos, c-jun e junB têm pico de expressão após 1h de estimulação por ACTH e fosB, fra-1 e fra-2 após 2h de estimulação, junD é uma exceção, sendo constitutivamente expresso a nível de mRNA. As respectivas proteínas apresentam perfis cinéticos semelhantes

porém com 1h de atraso em relação aos mRNAs, a proteína de junD também é induzida após 2h de tratamento. (Kimura et al, 1993a) Estes resultados sugerem que ACTH é capaz de modular a atividade do complexo de transcrição AP-1 através da expressão de Fos e Jun.

ACTH inibe a expressão de c-myc

A expressão de c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial é constitutiva, talvez devido ao fato desta célula apresentar alta atividade de c-Ki-Ras, que ativa a via de MAP quinases cujo alvo inclui expressão de c-myc. Células Y-1, em crescimento exponencial, quando tratadas com ACTH apresentam redução dos níveis de mRNA e proteína de c-myc (Kimura et al, 1993b e resultados não publicados) Esta redução ocorre após 2h de tratamento com ACTH. É bastante tentadora a idéia de se relacionar o bloqueio do ciclo celular de Y-1 promovido por ACTH com a diminuição dos níveis de c-myc.

O Controle de Expressão Gênica X Proliferação

Fica claro até o momento que ACTH tem efeito dual sobre Y-1: em tratamentos curtos induz proliferação, enquanto que em tratamentos longos bloqueia o ciclo celular. ACTH também promove indução de fos e jun, que estão relacionados com proliferação, mas inibe expressão de c-myc, que também tem papel importante na progressão do ciclo celular.

É notória, em células Y-1, a correlação entre a estimulação da entrada na fase G1 com a indução dos proto-oncogenes das famílias fos e jun e, por outro lado, entre o bloqueio do ciclo celular e a inibição da expressão de c-myc.

O Mecanismo de Ação de ACTH Envolve Outra Via que não é PKA

Segundo os resultados publicados por Schimmer e colaboradores (Rae et al, 1987), derivados de cAMP (dibutiril-cAMP ou 8Br-cAMP) deveriam ser capazes de mimetizar todos os efeitos de ACTH em Y-1. Isto é verdadeiro no que diz respeito ao arredondamento celular, à síntese de hormônios esteróides, ao bloqueio do ciclo celular e à inibição da expressão de c-myc, porém derivados de cAMP não são capazes de induzir expressão de c-fos, fosB e c-jun. Estes resultados sugerem que a via adenilato ciclase-cAMP-PKA não é a única ativada por ACTH.

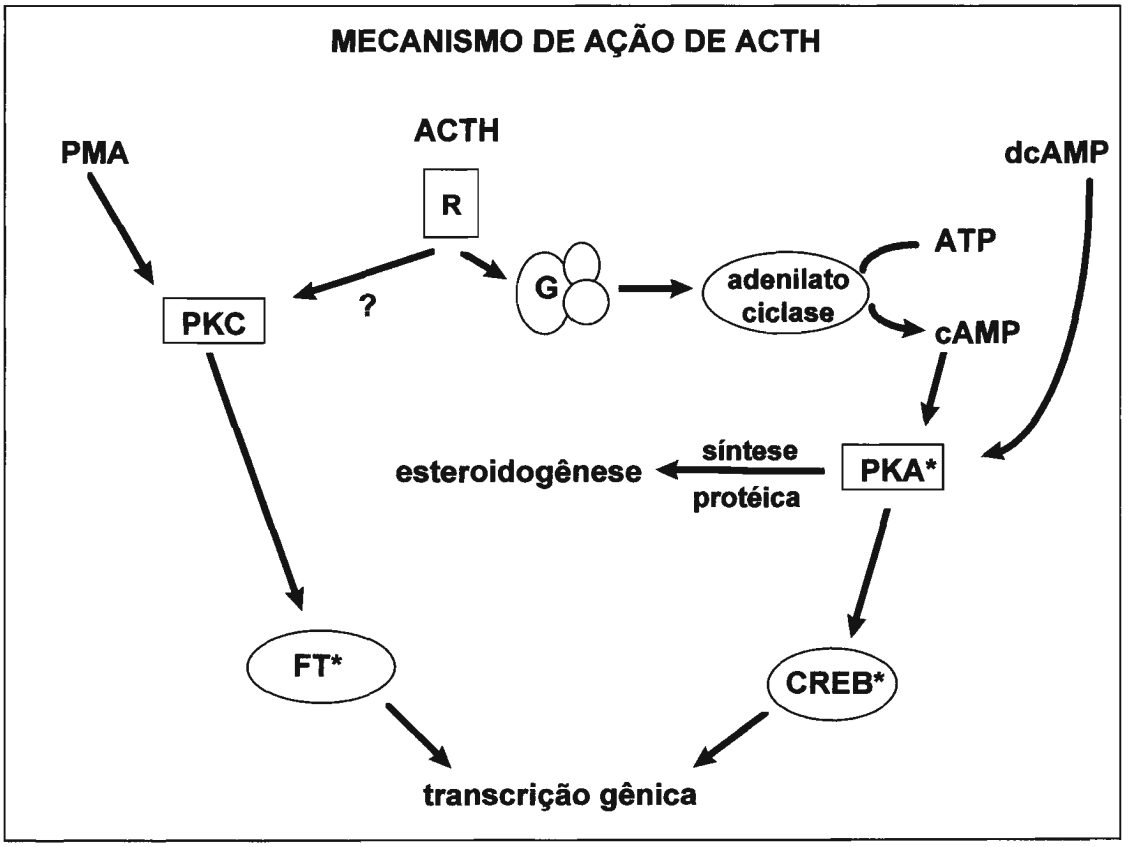
Experimentos feitos com os mutantes PKA^- de Y-1 obtidos no laboratório do Prof. Schimmer (Universidade de Toronto, Canadá), mostram o seguinte: nenhum derivado de cAMP é capaz de induzir a expressão de fosB, ACTH também não é capaz de induzir expressão de fosB, porém PMA (Phorbol-12 Myristate-13 Acetate) é capaz de fazê-lo e se as células forem tratadas simultaneamente com ACTH e PMA há um efeito sinergístico em relação à expressão de fosB (Kimura & Armelin, resultados não publicados). Estes resultados corroboram a idéia inicial de que ACTH ativa outra via além da via de PKA.

PMA é um conhecido ativador de PKC (Protein Kinase C), pois devido a sua estrutura é capaz de ficar inserido na membrana da célula mimetizando diacilglicerol, do qual a atividade de PKC é dependente. PMA também é capaz de mimetizar os principais efeitos de ACTH em células Y-1, principalmente no que diz respeito à indução da expressão dos proto-oncogenes das famílias fos e jun (Kimura & Armelin, 1990; Kimura et al, 1993c). Em relação a inibição da expressão de c-myc, PMA tem efeito oposto, ou seja PMA é um indutor da expressão de c-myc.

Resultados recentes obtidos no laboratório mostram que ACTH promove ativação de PKC, seguindo o mesmo padrão de ativação provocado por PMA: 30 min de tratamento com ACTH ou PMA ativam igualmente PKC e 12h de tratamento com ACTH inibe a atividade de PKC como seria esperado para PMA (Frigeri & Armelin, 1996).

O Apêndice 1 mostra um resumo de das informações disponíveis até o momento sobre o mecanismo de ação de ACTH, e os efeitos que são mimetizados por PMA e derivados de cAMP em células Y-1.

Apêndice 1: Mecanismo de ação de ACTH em células Y-1.



Esta figura representa ACTH ligando-se a R, o receptor na membrana da célula, capaz de ativar G, proteína G, que por sua vez ativa a via de PKA, responsável pela função da célula Y-1, esteroidogênese e também por regulação da transcrição gênica, através da ativação do fator de transcrição CREB. Por outro lado, o receptor de ACTH, R, poderia estimular PKC, que por sua vez controla transcrição gênica através de fosforilação de fatores de transcrição FT. PMA é capaz de ativar PKC diretamente e dcAMP é capaz de ativar PKA.

II. Objetivos

As informações apresentadas na introdução nos mostram que ACTH é um regulador da expressão gênica em Y-1, tendo efeito sobre os proto-oncogenes das famílias fos e jun e sobre o proto-oncogene c-myc. O efeito deste hormônio sobre a expressão destes genes é antagônica, assim como o efeito sobre a proliferação. Vimos também que derivados de cAMP mimetizam os efeitos de ACTH, como seria esperado, com exceção da indução da expressão dos proto-oncogenes c-fos, fosB e c-jun, por outro lado, PMA, que ativa a via de proteína quinase C (PKC), também mimetiza os efeitos de ACTH em Y-1, com exceção da inibição da expressão do proto-oncogene c-myc.

Como descrito também na introdução, a atividade do complexo AP-1 pode ser modulada pela expressão dos genes fos e jun, tradução das proteínas e modificações pós-traducionais. Sabemos como é a expressão destes genes em células Y-1 em crescimento exponencial tratadas com ACTH, PMA e derivados de cAMP, os resultados obtidos provém de experimentos de Northern Blot onde detecta-se a quantidade de RNA total da célula em um equilíbrio entre transcrição, degradação e tradução. Também sabemos que há tradução das proteínas Fos e Jun mas não temos nenhum dado sobre a atividade destas proteínas ou se há algum tipo de modulação pós- traducional.

Com relação ao proto-oncogene c-myc, sabemos que em culturas exponenciais de Y-1, tratamento com ACTH promove inibição da expressão do mRNA, mas não sabemos se a nível de transcrição ou estabilidade do mesmo.

Tendo como meta principal detectar pontos de regulação da expressão e atividade das proteínas fos, jun e myc, nossos objetivos são:

1. Estudar atividade dos fatores de transcrição AP-1 em células Y-1 estimuladas com ACTH, PMA e dcAMP, através de ensaios de ligação em oligonucleotídeos com sequências consenso TRE e CRE.

2. Verificar como é o controle de transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e myc em células Y-1 estimuladas com ACTH, PMA, dcAMP e FCS (soro fetal bovino), através de ensaios de elongação de cadeia nascente de RNA (run off transcription assays)

3. Verificar se existem alterações da meia-vida dos mRNAs dos genes fos e jun, dependentemente do tratamento a que as células são submetidas. Para estudar a cinética de degradação, os mRNAs extraídos de células estimuladas com ACTH, PMA ou dcAMP e, posteriormente tratadas com ActinomicinaD, foram analisados através de experimentos de Northern blot.

III. Materiais e Métodos

Materiais

Linhagem Y-1

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

Bactérias

Bactérias HB101, estoque mantido em freezer -70°C, congeladas em LB 20% glicerol.

Plasmídeos

Os plasmídeos listados abaixo foram utilizados nas hibridizações Northern blot, fragmentos com os genes de interesse foram utilizados para slot blot. A descrição abaixo mostra: o nome dos plasmídeos, o tamanho dos fragmentos dos DNAs de interesse contidos em cada plasmídeo, o tamanho dos transcritos dos respectivos genes em fibroblastos e a origem dos plasmídeos.

- cDNA c-fos (Deg 14 c-fos), fragmento de 1,6 Kb, transcrito de 2,2 Kb (obtido do laboratório de Rodrigo Bravo, Bristol Myers Squibb Institute, Nutley, NJ).
- cDNA fosB (pGEM1-fosB), fragmento de 1,8 Kb, transcrito de 5,1 Kb (Zerial et al, 1989)
- cDNA fra-1,fragmento de 1,5 Kb, transcritos de 1,8, 3,3 Kb (obtido do laboratório de Rodrigo Bravo, Bristol Myers Squibb Institute, Princeton, NJ)

- cDNA fra-2 (pGEM-fra-2), fragmento de 1,2 Kb, transcritos de 1,75, 2,3, 6,0 Kb (obtido do laboratório de Tom Curran, Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, NJ)
- cDNA c-jun (LK588 c-jun), fragmento de 2,2Kb, transcrito de 2,7 e 3,2 Kb (Kovary, não publicado).
- cDNA junB (Bluescript junB), fragmento de 1,5 Kb, transcrito de 2,1 Kb (Almendral et al,1988)
- cDNA junD (Bluescript junD), fragmento de 1,4 Kb, transcrito de 2,0 Kb (Hirai et al, 1989).
- c-myc genômico (pBC001 myc), fragmento de 4,0 Kb, transcrito de 2,3 Kb (Stewart et al, 1984).
- GAPDH genômico (pRGAPDH -1), transcrito de 1,4 Kb (Piechaczyck et al, 1984).

Drogas

ACTH, purificado de extrato de hipófise, procedência Sigma. Utilizado sempre em concentração saturante, 0,1U/ml a 0,3 U/ml, determinada a partir de ensaio de tomada de H^3 timidina observando efeito máximo de bloqueio de entrada em S. Solução estoque 100U/ml, em PBSA.

PMA, procedência Sigma. Utilizado sempre em concentração 10ng/ml, a partir de solução estoque 10 µg/ml em etanol absoluto.

Derivado de cAMP, dibutiril cAMP, procedência Sigma. Utilizado em concentração de 0,5 mM, a partir de estoque 0,1M em PBSA.

ActinomicinaD, procedência Sigma. Utilizada em concentração de 5µg/ml, determinada a partir de ensaio de dose-resposta para tomada de H^3 Uridina. Solução estoque em etanol absoluto.

Cicloheximida, procedência Sigma. Utilizada em concentração 10µg/ml, determinada a partir de dados da literatura (Edwards & Mahadevan, 1992).

Puromicina, procedência Sigma. Utilizada em concentração 10µg/ml, determinada a partir de dados da literatura (Edwards & Mahadevan, 1992).

Isótopos radioativos

γ ^{32}P dATP (3000 Ci/mmol), procedência Amershan

α ^{32}P dATP (3000 Ci/mmol), prodecência Amershan ou Du Pont

α ^{32}P dCTP (3000 Ci/mmol), prodecência Amershan ou Du Pont

α ^{32}P UTP (3000 Ci/mmol), prodecência Amershan ou Du Pont

α ^{32}P ATP (3000 Ci/mmol), prodecência Amershan ou Du Pont

Enzimas

Enzimas de restrição: Hind III, EcoRI, Bam HI, Bgl II, Sca I, Xhol, Pst I procedência Pharmacia.

T4 Polinucleotídeo Kinase, procedência Pharmacia.

Klenow Large Fragment DNA Polimerase, procedência Pharmacia ou USB (United States Biochemical).

Tripsina, solução 0,1% em 1mM EDTA, em PBSA. Procedência Sigma.

RNase de pâncreas bovino, procedência Sigma, solução estoque 10mg/ml em TE estéril.

Proteinase K, procedência Sigma, solução estoque 10mg/ml em TE estéril.

Oligonucleotídeos

Poly dI.dC-dI.dC, procedência Pharmacia

Random Primer, procedência Pharmacia

Oligonucleotídeo com sequência consenso TRE (em negrito) para ensaio de retardamento de oligonucleotídeo em gel, sequência:

5'TCGAAGCTA**TGACTCA**TCCG 3'
3'TCGAT**ACTGAGT**AGGCAGCT 5'

Doado pela Dra. Karla Kovary, laboratório Dr. Rodrigo Bravo, Squibb & Meyers (não publicado).

Oligonucleotídeo com sequência consenso CRE (em negrito) para ensaio de retardamento de oligonucleotídeo em gel (Ryseck & Bravo, 1991), sequência:

5'ATACAGAT**GACGTCA**CTCCTC 3'
3'TATGTCT**ACTGCAGT**GAGGAG 5'

Procedência: sintetizado no laboratório do Prof. Dorry El Hamza, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, USP.

Métodos

Cultura de Células

Em cultura, as células são mantidas em garrafas de poliestireno, em meio DME (Dubbelco's Modified Eagle's Medium, Sigma), suplementado com 1,2 g/l bicarbonato de sódio, 25 mg/l ampicilina, 100 mg/l sulfato de estreptomicina e 10% soro fetal bovino (FCS) obtido da Cultilab ou Gibco-BRL, em estufa com circulação de mistura de ar e 5% CO_2.

Troca-se o meio de cultura das garrafas a cada 2 ou 3 dias. Quando necessário as células são subcultivadas ou expandidas. O procedimento consiste em aspirar o meio da garrafa, lavar as células com PBSA (solução salina isotônica sem sais de Ca^{+2} e Mg^{+2}), soltar as células do substrato através de digestão com tripsina, a suspensão é diluída em PBSA ou DME 10% FCS e distribuída em várias garrafas, no caso de expansão ou uma fração é transferida para outra garrafa, no caso de subcultura. O mesmo procedimento é utilizado para plaqueamentos e a suspensão de células é distribuída em placas de Petri com meio de cultura.

Carenciamento

O carenciamento é feito com as células em subconfluência, consiste em lavar a placa 2 vezes com PBS e então adicionar o volume adequado de meio DME sem soro fetal bovino ou qualquer outro fator de crescimento. O carenciamento dura 48h, em seguida é feito o experimento.

Todos os experimentos são feitos com as células em subconfluência (aproximadamente 90% de confluência).

Manipulação de Bactérias

Obtenção de bactérias competentes

As preparações de bactérias competentes foram feitas a partir de 500 ml de suspensão de bactérias em meio LB (0,03 a 0,08 OD a 600 nm). Cada preparação consistiu em sedimentar as bactérias a 4200g, ressuspendê-las em 0,1M Ca_2Cl, incubá-las em gelo por 30 min, e repetir o procedimento de sedimentação da suspensão em Ca_2Cl (0,3 a 0,8 OD a 600nm), desta vez adicionou-se 20% do volume final de glicerol. A suspensão foi aliquotada e congelada em nitrogênio líquido e mantida em freezer -80°C.

Transformação de bactérias competentes

Para transformar bactérias tomou-se 200µl de uma suspensão de bactérias competentes (O.D.=0,3 a 0,8) juntamente com 100 ng do plasmídeo de interesse, misturando-os em um tubo Eppendorf estéril. Incubou-se por 30 min em gelo. A suspensão foi transferida do gelo para banho a 37°C e incubada por 5 min. Em seguida, foi novamente transferida para gelo e incubada por 10 min.

Adicionou-se, então 1,3 ml de meio LB líquido à suspensão e incubou-se a 37°C por pelo menos 30 min, permitindo que as bactérias crescessem.

As bactérias foram semeadas em meio LB sólido, contendo o antibiótico necessário para a seleção das bactérias transformadas (60µg/ml ampicilina ou 50µg/ml tetraciclina). As placas com bactérias foram incubadas por 12h a 37°C. As colônias obtidas foram selecionadas e consideradas transformadas.

As bactérias transformadas foram replicadas a cada 15 dias para placas com meio fresco ou congeladas em meio com 20% glicerol.

Preparação de plasmídeos em pequena, média e larga escala

As preparações em pequena escala seguiram o procedimento de lise alcalina, exatamente como descrito por Sambrook et al, 1989.

As preparações de larga escala seguiram também o procedimento de lise alcalina (Sambrook et al, 1989), porém o DNA plasmidial foi isolado por extração com fenol/clorofórmio (1:1), seguida de precipitação com 3M acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol. O sedimento de DNA, após lavagem com 70% etanol e secagem, foi submetido a digestão com 20µg/ml RNase de pâncreas bovino a 37°C por 1h e em seguida digestão com 10µg/ml proteinaseK a 42°C por 30 min. Nova extração com fenol/clorofórmio foi feita e o DNA foi precipitado sob as mesmas condições utilizadas anteriormente. O sedimento final foi ressuspenso em H_2O MilliQ estéril ou TE estéril. Uma alíquota foi retirada e a concentração foi determinada em gel de agarose por comparação com um padrão ou por absorbância a 260nm.

As preparações de média escala foram feitas de acordo com a metodologia de lise alcalina, porém o DNA foi isolado utilizando-se o "kit" Sephaglas BandPrep Kit Pharmacia, onde o DNA plasmidial interage com uma resina de sílica, é lavado e em seguida eluído com TE estéril. Ou ainda utilizou-se o "kit" Hybaid Plasmid Midi Prep sample Kit, neste caso a lise também é alcalina, utilizando reagentes do "kit".

Em todos os casos, os DNAs amplificados foram quantificados em gel de agarose com 0,5µg/ml brometo de etídio.

Nos casos em que houve necessidade de extração de fragmento contendo o gene de interesse, o plasmídeo foi submetido a digestão com as enzimas de restrição apropriadas, o produto da digestão foi fracionado em gel 1% agarose com 0,5µg/ml brometo de etídio em 1x TBE. A banda correspondente ao fragmento foi retirada do gel e o DNA foi extraído da agarose utilizando-se o "kit" Sephaglas BandPrep Kit Pharmacia.

Ensaio de dose-resposta a ActinomicinaD

Células Y-1 foram semeadas em placas de 15 mm de diâmetro em densidade de 5.10^4 células/placa em 1ml de DME 10% FCS. Ao atingirem o estado de subconfluência as células foram tratadas com ActinomicinaD em concentrações de 1µg/ml ou 5µg/ml ou 10µg/ml por períodos de 15 ou 30 min.

Em seguida fornecemos às células H^3 uridina (5μCi/ml) e estas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 min.

Após este período as células foram lavadas com PBS gelado 2 vezes e fixadas com 10% TCA incubando-se 2 vezes, 10 min cada vez a 4°C. As células foram lisadas com 0,5N NaOH e o lisado foi adsorvido em filtros de celulose. Os filtros foram lavados uma vez em 10% TCA gelado por 10 min, uma vez em etanol e uma vez em acetona. Em seguida foram colocados em estufa (50°C) por pelo menos 2h para secagem. Uma vez secos, os filtros foram colocados em frascos com 5 ml de líquido de cintilação e a radioatividade incorporada foi dosada em cintilador.

Ensaio de retardamento de oligonucleotídeo em gel - Medida da atividade de AP-1

Preparação de extratos nucleares

As células Y-1 foram semeadas em placas de Petri de 100 mm de diâmetro e ao atingirem o estado de subconfluência, crescendo exponencialmente em DME 10% FCS, as células foram tratadas com ACTH, PMA e dibutiril cAMP. Em alguns experimentos, Cicloheximida ou Puromicina foram adicionadas ao meio 20 min antes das adições de ACTH, PMA e dcAMP. Após o tratamento, foi feita a extração segundo o procedimento descrito por Andrews & Faller (1991) baseado no procedimento descrito em Ausubel et al, 1987, com algumas modificações. Este procedimento, que consiste em lisar as células, separando-se o compartimento nuclear do restante, para então fazer-se a extração das proteínas nucleares, é o seguinte:

1. As células foram lavadas 2 vezes com PBSA, raspadas da placa, com o auxílio de um "policial" (cell scraper) e transferidas para um tubo cônico com PBSA.

2. As células foram sedimentadas por centrifugação a 1500 rpm por 5 min em centrifuga analítica.

3. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de PBSA, a suspensão foi transferida para um tubo Eppendorf.

4. As células foram sedimentadas por centrifugação a 14.000 rpm por 15 s, em microcentrífuga.

5. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400 μl de tampão hipotônico, a suspensão foi deixada 10 min no gelo.

6. As células foram lisadas por adição de Ninodet P-40 (0,1%) e agitação em "vortex" por 30 s (velocidade máxima).

7. A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 s, obtendo-se assim a fração nuclear (sedimento) e a fração citoplasmática (sobrenadante).

8. A fração citoplasmática foi descartada e o sedimento de núcleos foi lavado com 100 μl de tampão hipotônico.

9. O sedimento foi ressupenso em 100 μl de tampão de extração nuclear onde ficaram por 30 min, em gelo.

10. Os núcleos foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 min, sendo o sobrenadante o extrato nuclear.

11. O extrato nuclear foi aliquotado, congelado em nitrogênio líquido e estocado a - 80°C.

Todo o processo foi feito a 4°C, sendo utilizados tampões e equipamentos pré-resfriados. Utilizamos, em todos os tampões, como inibidores de proteases: Pepstatina A (2 μM), Leupeptina (0,6 μM), Aprotinina (25 mU/ml) e PMSF (0,5 mM).

Alíquotas foram retiradas da fração nuclear (núcleos ressuspensos em tampão de extração nuclear), da fração citoplasmática, da suspensão de células lisadas e do extrato nuclear para que fazer dosagem de proteína (Método de Bradford,1976). Esta dosagem nos deu informações quanto ao rendimento da extração nuclear, à reprodutibilidade dos diversos experimentos, assim como uma noção da eficiência da lise celular.

Tampão hipotônico: 10,0 mM HEPES pH 7.9 a 4°C
10,0 mM KCl
0,1 mM EDTA
0,1 mM EGTA
1,0 mM DTT

Tampão de extração nuclear: 20,0 mM HEPES pH 7.9 a 4°C
0,4 M NaCl
1,0 mM EDTA
1,0 mM EGTA
1,0 mM DTT
1,0 mM PMSF

Reação de ligação a DNA e eletroforese em gel de poliacrilamida

Nesta etapa do ensaio propiciou-se a reação entre as proteínas do extrato nuclear e os oligonucleotídeos marcados, em seguida separou-se os produtos das reações em gel de poliacrilamida.

Primeiramente o gel vertical 4% de poliacrilamida (37,5 acrilamida:1 bisacrilamida) em 0,4x TBE, foi polimerizado e pré-corrido a 100V por 2 h.

As reações foram preparadas em gelo e contendo basicamente:

- 5 μg de proteína do extrato nuclear
- 4 μg de Poly dI.dC-dI.dC
- 1 pmol de oligonucleotídeo marcado com ^{32}P
- tampão de amostra até 20 μl
- 0,5 mM DTT
- 0,5 mM PMSF

Tampão de amostra: 20,0 mM HEPES, pH 7.9, 4°C
20% glicerol
100,0 mM KCl (Robidoux & Guérin, 1992)
0,2 mM EDTA

As reações foram incubadas a 30°C por 15 min. Após este período as mesmas foram recolocadas no gelo e receberam, cada uma 2 μl de uma solução de Azul de Bromofenol em TE 50% glicerol. As amostras foram aplicadas no gel, já pré-corrido e submetidas a eletroforese a 170 V, amperagem não limitante.

Após a corrida o gel foi fixado em solução 10% ácido acético, 20% etanol (2 lavagens de 20 min cada). Após a fixação, o gel foi seco sobre papel 3MM, sob vácuo a 80°C. Sobre o gel seco foi exposto um filme de raioX, em um cassete entre telas intensificadoras e deixado a -70°C, durante o período desejado até a revelação do filme.

Os filmes de raioX foram analisados por densitometria.

Marcação de oligonucleotídeo

Esta reação consistiu em "marcar" o oligonucleotídeo através de fosforilação das extremidades 5' com γ^{32}PATP. Esta reação é catalisada pela enzima T4 Polinucleotídeo Kinase. O procedimento utilizado foi baseado no procedimento descrito por Sambrook et al (1989). A reação contém:

- 5 a 20 pmol de oligonucleotídeo
- γ^{32}PATP (3000 Ci/mmol) 50pmol
- 5 a 10U T4 Polinucleotídeo Kinase
- 10 x tampão de PNK
- H_2O até 20 μl

A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Adicionou-se à mesma 80 μl de TE 0,1 M NaCl, sendo este o volume final. Fez-se então uma extração com 100 μl de fenol/clorofórmio (1:1), adicionando-se estes à reação. Após agitação, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 min. O oligonucleotídeo, fração aquosa resultante da centrifugação anterior, foi passado então por coluna de 1 ml de Sephadex G50, a 2700 rpm, por 4 min e estocado a -20°C.

Alíquotas do oligonucleotídeo foram retiradas antes e depois da passagem do mesmo pela coluna de Sephadex e submetidas a cintilação.

Este procedimento nos permitiu medir a atividade específica dos oligonucleotídeos marcados.

Ensaio de Elongação de Cadeia Nascente de RNA - Cinética de transcrição de fos, jun e c-myc

Este ensaio foi utilizado com o propósito de medir-se a cinética de transcrição dos genes de interesse em células Y-1 tratadas com diferentes fatores. O ensaio consiste do isolamento dos núcleos de células tratadas, de forma que eles continuem funcionais, ou seja capazes de transcrever, e posterior continuação da polimerização de cadeias de RNA já iniciadas, porém com fornecimento de um ou mais precursores marcados radioativamente. O RNA marcado é então isolado e hibridizado com "slots" de DNA dos genes de interesse (Ausubel et al, 1987).

Isolamento de núcleos

Células Y-1 foram semeadas em placas de 500 cm^2, ao atingirem a densidade desejada as células foram carenciadas, ou se o experimento fosse utilizar células em crescimento exponencial, o meio foi trocado 24h antes do experimento.

As células foram submetidas aos seguintes tratamentos: ACTH, PMA ou dibutiril cAMP por 15 min, 30 min, 1h, 2h e 3h, no caso de células em crescimento exponencial; ou ACTH, PMA , dibutiril cAMP ou 10% soro fetal bovino por 15 min, 30 min, 1h, 2h e 3h, no caso de células carenciadas. Após os citados tratamentos as células foram lisadas e os núcleos isolados como descrito a seguir:

1. Cada placa foi lavada 2 vezes com PBS-A gelado.

2. As células foram raspadas em PBS-A com o auxílio de um "cell scraper" ou "policial" e transferidas para um tubo cônico.

3. As células foram sedimentadas por centrifugação a 1500 rpm em centrífuga clínica.

4. O sedimento foi disperso por agitação em "vortex", em velocidade máxima.

5. Sobre o sedimento, ainda em agitação, pipetou-se 4ml de solução de lise, agitou-se por mais 10s.

6. A suspensão foi incubada em gelo por 5 min.

7. A suspensão, agora de núcleos foi sedimentada em centrífuga analítica a 3000 rpm por 5 min.

8. O sobrenadante foi descartado, o sedimento de núcleos foi disperso sob agitação máxima em "vortex". Procedeu-se como no passo (5).

9. A suspensão foi sedimentada como no passo (7).

10. O sobrenadante foi descartado e o sedimento nuclear foi ressuspenso em 150µl de tampão de estocagem e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

Observação: todos os reagentes utilizados foram esterilizados e utilizados a 4°C ou mantidos em gelo, assim como a centrífuga foi pré-resfriada e utilizada à temperatura de 4°C.

Alíquotas foram retiradas da suspensão de núcleos no tampão de estocagem e o número de núcleos foi determinado por contagem em hemocitômetro (Câmara de Neubauer). O procedimento fornece de 2,0 a $2{,}5.10^8$ núcleos por placa.

Tampão de lise: 10,0 mM Tris HCl, pH 7,4
10,0 mM NaCl
3,0 mM $MgCl_2$
0,5% Nonidet P-40

Tampão de estocagem: 40% glicerol
5,0 mM $MgCl_2$
50,0 mM Tris HCl, pH 8,0
0,1 mM EDTA

Preparação das membranas com o DNA fixado ("Slot blot")

Cada preparação de RNA nuclear foi hibridizada com uma tira de membrana de nitrocelulose contendo amostras de DNA desnaturado. No caso utilizou-se 2µg de fragmento dos plasmídeos correspondentes aos genes de interesse. Os fragmentos isolados, conforme descrito anteriormente, foram desnaturados, em tubos Eppendorf incubados em água fervendo por 10 min. Os fragmentos desnaturados foram diluídos em solução 8x SSC e fixados na membrana utilizando-se o aparato "The Convertible Filtration Manifold System" da Gibco BRL. Após a aplicação dos fragmentos, as membranas foram fornadas a 80°C por 2h, estando prontas para a hibridização.

Reação de elongação das cadeias nascentes de RNA

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

Os núcleos foram descongelados à temperatura ambiente e imediatamente diluídos em 1 volume de tampão de reação, recém preparado, em seguida a suspensão foi levada a banho a 37°C, com agitação periódica. Após 30 min de incubação, adicionou-se 10mM ATP e 10mM UTP em cada reação e incubou-se mais 5 min a 37°C. Imediatamente os núcleos foram lisados por adição de 1ml de 4M guanidina isotiocianato com 1mM β-mercaptoetanol. A partir deste lisado foi feita a extração do RNA nuclear.

Tampão de reação:

2x tampão de reação sem precursores

40 U/ml RNasin (Pharmacia)

10 mM CTP

10mM GTP

0,40 mCi α^{32}P UTP

0,40 mCi α^{32}P ATP

0,1 mM DTT

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

5,0mM $MgCl_2$

0,3 M KCl

Extração e purificação do RNA nuclear

A extração do RNA nuclear foi feita de acordo com procedimento descrito por Sambrook et al, 1989, que utiliza ultracentrifugação do lisado em colchão de cloreto de césio. As amostras de RNA obtidas após a extração e purificação foram imediatamente diluídas em solução de hibridização e hibridizadas. Alíquotas de cada amostra foram retiradas, as atividades dos RNAs obtidos foram determinadas em cintilador, em média a atividade das preparações de RNA, em diferentes experimentos, oscilou entre $0,5.10^6$ a 5.10^6 cpm/preparação de RNA.

Pré-hibridização, hibridização, lavagem e exposição das membranas

As membranas foram hibridizadas e pré-hibridizadas em solução contendo: 50% formamida, 5x SSPE, 5x Denhardt, 0,1% SDS e 0,1 mM NaPPi. As membranas foram pré-hibridizadas por 3h a 42°C e hibridizadas por 24h à mesma temperatura.

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

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

Os filmes foram revelados e fixados (revelador e fixador Kodak) e os filmes de raioX foram quantificados por densitometria e análise de imagem pelo programa Image Analyst - Bio Rad.

Ensaios de Northern Blot - Medida da meia-vida dos mRNAs fos e jun

Este ensaio foi utilizado com o propósito de detectar alterações na meia-vida do mRNAs dos genes das famílias fos e jun em células estimuladas por ACTH, PMA, dibutiril cAMP (dcAMP). Para isto as células foram semeadas em placas de 100mm de diâmetro, carenciadas, tratadas com os fatores citados acima, segundo o seguinte protocolo de estimulação: a partir do tempo 0, fim do carenciamento, as células são tratadas por 1h ou 2h com ACTH, PMA ou dcAMP, nos tempos 1h ou 2h de tratamento adiciona-se 5µg/ml ActinomicinaD em cada placa. As coletas são feitas então de 15 em 15 min até 1h e após 2h e 3h de tratamento com ActinomicinaD.

Extração de RNA total

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBSA gelado 2 vezes e sobre a camada de células pipeta-se 0,5 ml de solução 4M guanidina isotiocianato com 1 mM β-mercaptoetanol. As células foram lisadas e o lisado foi transferido para um tubo Eppendorf estéril e congelado a -20°C até o momento da extração.

A extração de RNA total foi feita como descrito no procedimento abaixo:

1. Os lisados foram descongelados.

2. Cada tubo recebeu seqüencialmente, 50 µl de 2M acetato de sódio pH 4.0, 0,5ml de fenol saturado com H_2O e 100 µl de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (49:1) recém preparada.

3. Os lisados foram agitados em "vortex", velocidade máxima por 10s e resfriados em gelo por 15 min.

4. Os lisados foram centrifugados em microcentrífuga a 10000 rpm por 20 min a 4°C.

5. A fase aquosa foi coletada e transferida para um tubo limpo e estéril (o DNA e as proteínas do lisado ficaram na interface e na fase fenólica e foram descartados).

6. À fase aquosa, adicionou-se 0,5 ml de isopropanol, misturou-se bem e deixou-se a -20°C por 45 min.

7. Centrifugou-se a mistura em microcentrífuga a 10000 rpm por 15 min.

8. O sobrenadante foi descartado e cada tubo foi emborcado sobre papel absorvente estéril e deixado por alguns minutos até que o sedimento secasse.

9. O sedimento foi ressuspenso em 0,3 ml da solução utilizada para a lise das células.

10. À solução adicionou-se 0,3 ml de isopropanol e incubou-se a mistura a -20°C por 45 min.

11. A mistura foi novamente centrifugada a 10000 rpm por 15 min.

12. O sedimento (RNA) foi lavado com 0,5 ml de etanol 75% gelado, seco e ressuspenso em até 100 µl de H_2O MilliQ estéril.

Os RNAs foram estocados a -20°C, sua concentração foi determinada através de medida de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro e calculada através da relação 1 unidade de A_{260} = 45 µg/ml RNA. O grau de pureza foi calculado pela relação A_{260}/A_{280} que deve ser 2,0 ou próximo deste valor.

Fracionamento de RNA em gel de agarose / formaldeído

Amostras de 15 µg de RNA foram diluídas em solução 16% formaldeído, 44% formamida, 9% tampão de amostra (10% glicerol, 2 mM EDTA, 0,025% azul de bromofenol, 0,025% xileno cianol), 1x MOPS. Cada amostra foi submetida a aquecimento a 65°C por 20 min, em seguida resfriada em gelo e aplicada em gel de 1% agarose contendo 18% formaldeído, 1x MOPS e 0,5µg/ml brometo de etídio.

A eletroforese foi efetuada em tampão 1x MOPS, sob uma diferença de potencial de 5 V por cm de distância entre o polo positivo e o negativo.

Após a corrida os géis foram lavados 3 vezes com H_2O destilada por 30 min, sob agitação, para a remoção do formaldeído. O brometo de etídio permitiu visualizar os RNAs ribossômicos 18S e 28S em ultravioleta, podendo-se monitorar a quantidade de RNA aplicado no gel.

O conteúdo de cada gel foi transferido por capilaridade para membrana de nitrocelulose em 15x SSC durante ~17h. Após a transferência as membranas foram lavadas em 6x SSC e fornadas por 2h a 80°C.

Pré-hibridização, hibridização, lavagem das membranas e exposição

As membranas de nitrocelulose foram pré-hibridizadas por ~3h a 42°C na solução: 50% formamida, 5x Denhardt 5x (ficoll 0,1%, polivinilpirridolina 0,1% e BSA 0,1%), 5x SSPE, 0,1% SDS, 50µg/ml DNA de esperma de salmão previamente desnaturado a 100°C.

A reação de hibridização foi incubada a 42°C de 36 a 40h na solução: 50% formamida, 5x Denhardt, 5x SSPE, 0,1% SDS, 50µg/ml DNA de esperma de salmão (previamente desnaturado), 5% sulfato dextrana e sonda (100 a 200 ng DNA marcado).

Após a hibridização, as membranas foram lavadas 3 vezes em solução 1x SSC e 0,1% SDS 15 min cada lavagem à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida as membranas foram lavadas com solução 0,1x SSC e 0,1% SDS, em 1 lavagem de 15 min à temperatura ambiente, sob agitação e uma lavagem de 15 min a 50°C, sob agitação.

Após as lavagens as membranas ainda úmidas foram envolvidas em filme de PVC e colocadas em cassetes, onde filmes de raioX ficaram expostos a cada uma, entre telas intensificadoras, a -70°C, por períodos variáveis.

A quantificação das bandas dos filmes foi feita por densitometria e análise de imagem pelo programa Image Analyst - Bio Rad.

Preparação de sondas radioativas

Os plasmídeos ou fragmentos contendo sequências dos genes das famílias fos e jun acima citados foram utilizados para a preparação das sondas.

As sequências foram marcadas com ^{32}P α dCTP com atividade específica de 3000Ci/mmol através da reação de "Random Primer Extension". Esta reação consiste na adição de desoxinucleotídeos a partir da extremidade 3'OH livre de um primer universal que se associa a trechos do DNA desnaturado. Utiliza-se a enzima Klenow para a catálise desta reação.

O DNA a ser marcado foi desnaturado por calor e incubado com o primer universal, com o precursor radioativo, com os outros desoxinucleotídeos frios e com a enzima Klenow por aproximadamente 3h à temperatura ambiente, ou a 37°C, dependendo da especifição do fabricante da enzima.

As sondas obtidas foram purificadas por cromatografia em coluna de Sephadex G-50, sendo posteriormente desnaturadas a 100°C por 5 min para então serem utilizadas para a hibridização.

Alíquotas foram retiradas das sondas marcadas para medir-se a atividade específica de cada uma em cintilador. Em média, a atividade específica das sondas obtidas foi de 10^8cpm/µg DNA utilizado.

Densitometria

Cinética de transcrição de fos, jun e c-myc

Os experimentos de elongação de cadeia nascente de RNA resultam, como descrito acima em filmes impressionados pelo RNA radioativo que hibridiza com os "slots" de DNA. A densitometria foi feita em densitômetro Bio Rad GS 700, por volume, ou seja, área da banda multiplicada pela densidade ótica, chamaremos este valor de volume. Para chegar aos resultados aqui apresentados adotamos alguns parâmetros de normalização dos valores obtidos:

- o valor absoluto obtido, volume, corresponde à área da banda multiplicada pela densidade ótica.

- para cada tira com "slots de DNA" determinamos uma área (igual a área determinada para todas as bandas) sobre o fundo que chamamos de branco (background). Por tira, subtraímos o branco do volume de cada banda, obtendo o que chamamos volume'.

- cada tira também contém uma banda de DNA genômico, em quantidade 1000 vezes menor que os outros. O objetivo desta medida é normalizar-se as outras segundo a quantidade de material utilizada em cada hibridização, já que teoricamente toda a população de RNA pode hibridizar com a banda de DNA genômico. O valor de volume' de cada banda foi dividido pelo volume' do DNA genômico da respectiva tira, obtendo-se assim o que chamamos de volume".

- tem-se ainda a necessidade de normalizar os valores entre tiras, assim tomamos o volume" máximo de cada experimento e dividimos cada volume" pelo volume" máximo. Ou seja, volume" máximo ganhou valor 1, e todos os outros são relativos a ele, a estes valores chamamos V.

resumindo: v=área da banda (mm^2)* OD

v-branco=v'

v'qualquer/v' DNA genômico=v"

v"qualquer/v"máximo=V, e V é o resultado apresentado.

Ensaio de atividade de AP-1

Os dados obtidos são os valores absolutos da integração da área de cada pico produzido, em um densitômetro Helena, por cada banda do filme. Para compararmos os resultados de cada experimento, transformamos os valores absolutos em valores relativos à área dos picos correspondentes à banda de soro de cada experimento.

Tratamento estatístico dos dados

Ensaio de Elongação de Cadeia Nascente de RNA

Os dados obtidos sobre os níveis de transcrição de c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial, foram analisados através do teste ANOVA: Fator Único. Esta abordagem executa uma simples análise de variância (anova) para testar a hipótese de que médias de 2 ou mais amostras são iguais.

Já os resultados obtidos em células Y-1 carenciadas, foram analisados pelo teste de χ^2. Neste caso, utilizamos um grupo de resultados esperados e um grupo de resultados observados. Lançamos a hipótese de que o grupo de resultados esperados é igual ao grupo de resultados obtidos e testamos. O resultado do teste fornece para cada caso, um valor *p*, que se for menor que o P crítico nos leva a aceitar a hipótese, caso contrário a hipótese é rejeitada. É importante ressaltar que os resultados provém de um único experimento, ou seja, esta análise é preliminar e poderá ser desviada por resultados de novos experimentos.

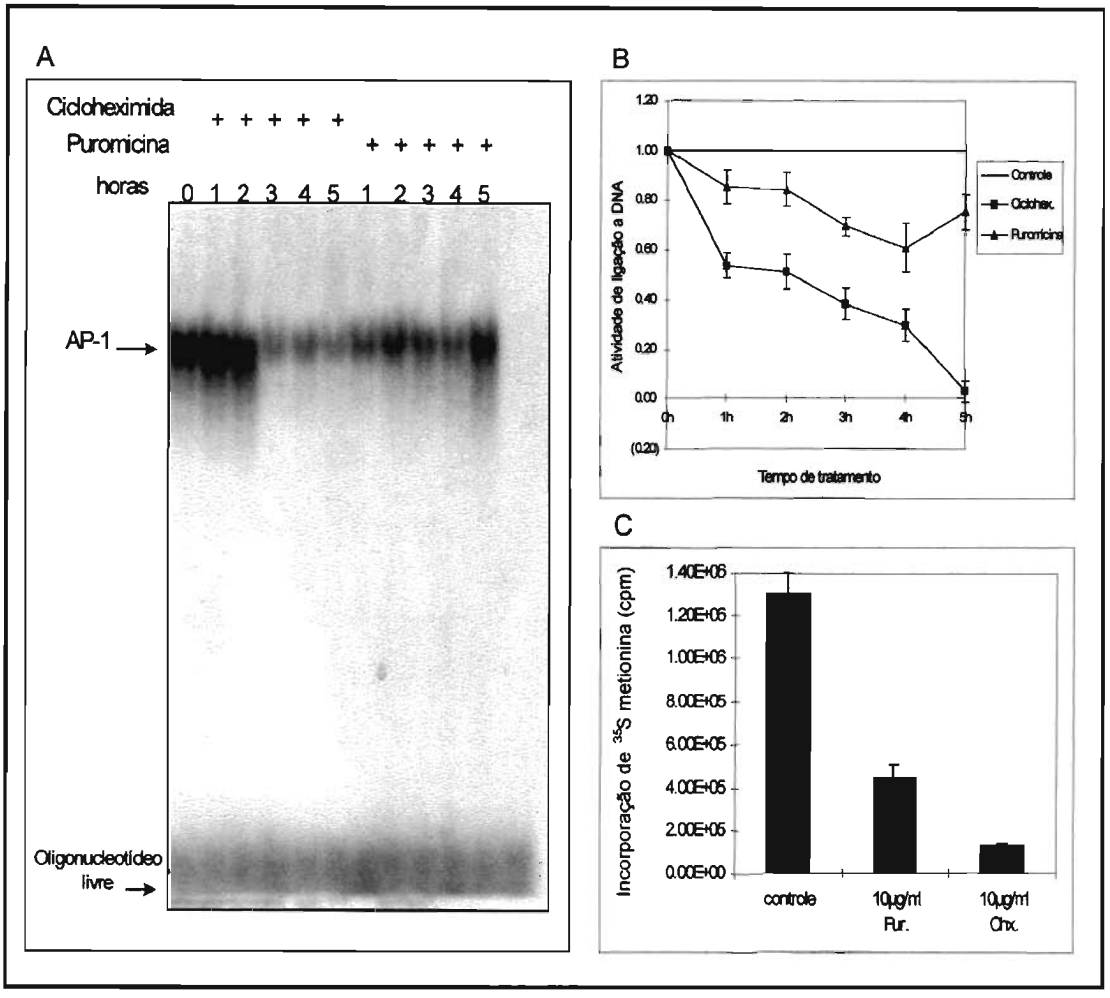
IV. Resultados

Ensaio de atividade de AP-1 em células Y-1

Os experimentos de ensaio de atividade de AP-1 foram feitos em células Y-1 em crescimento exponencial, tratadas com ACTH, PMA ou dcAMP. Nota-se que há um nível basal de atividade de AP-1 em células Y-1 em crescimento exponencial. Esta atividade basal é sensível ao bloqueio da síntese de proteína, pelos inibidores Cicloheximida e Puromicina. A figura 1, mostra que a queda de atividade de AP-1 em células Y-1 (figura 1B), correlaciona com a inibição de síntese proteica medida pela incorporação de ^{35}S metionina (figura 1C): Cicloheximida causa 92,3% e Puromicina 68,5% de inibição de síntese proteica, enquanto que a atividade de AP-1 é reduzida de mais de 95% com Cicloheximida e cerca de 35% com Puromicina, depois de 5h de tratamento.

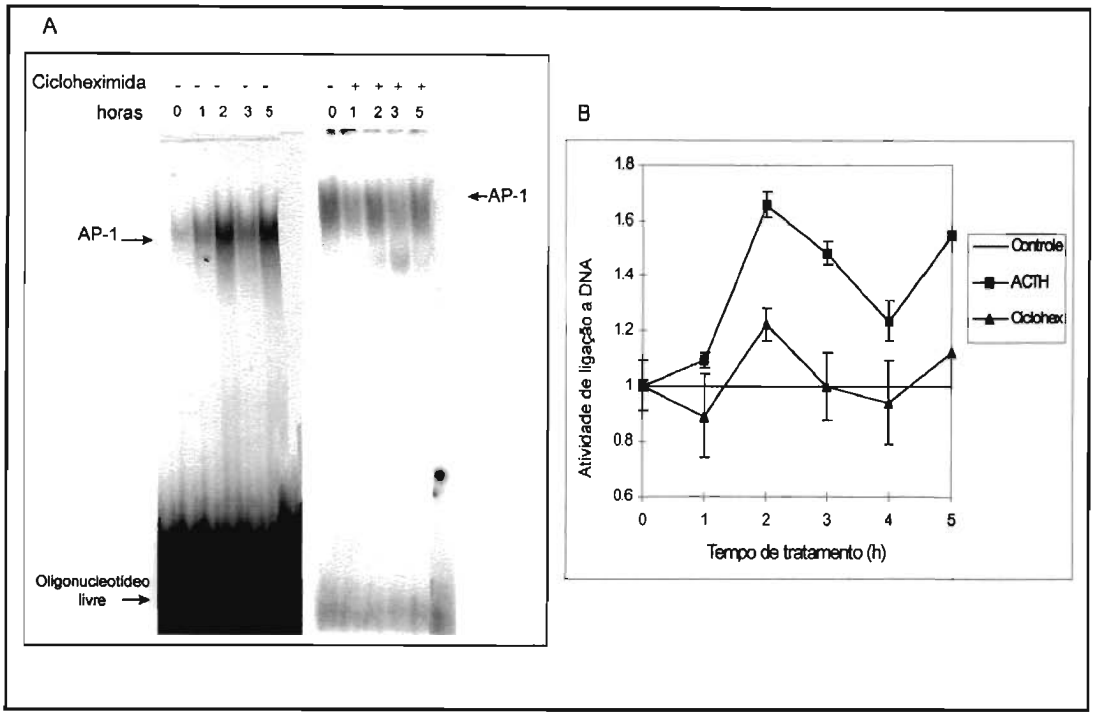
Células Y-1 tratadas com ACTH, PMA e dcAMP apresentam aumento da atividade de AP-1 tanto com oligonucleotídeo TRE, como CRE. Curiosamente, tratamento simultâneo com Cicloheximida não é capaz de anular completamente a atividade de AP-1. Ao contrário, apesar do tratamento com Cicloheximida, há ainda aumento da atividade de AP-1, em escala menor do que em células tratadas apenas com ACTH, PMA e dcAMP. Estes resultados estão apresentados nas figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

Figura 1: A atividade de AP-1 é sensível à inibição da síntese de proteína.



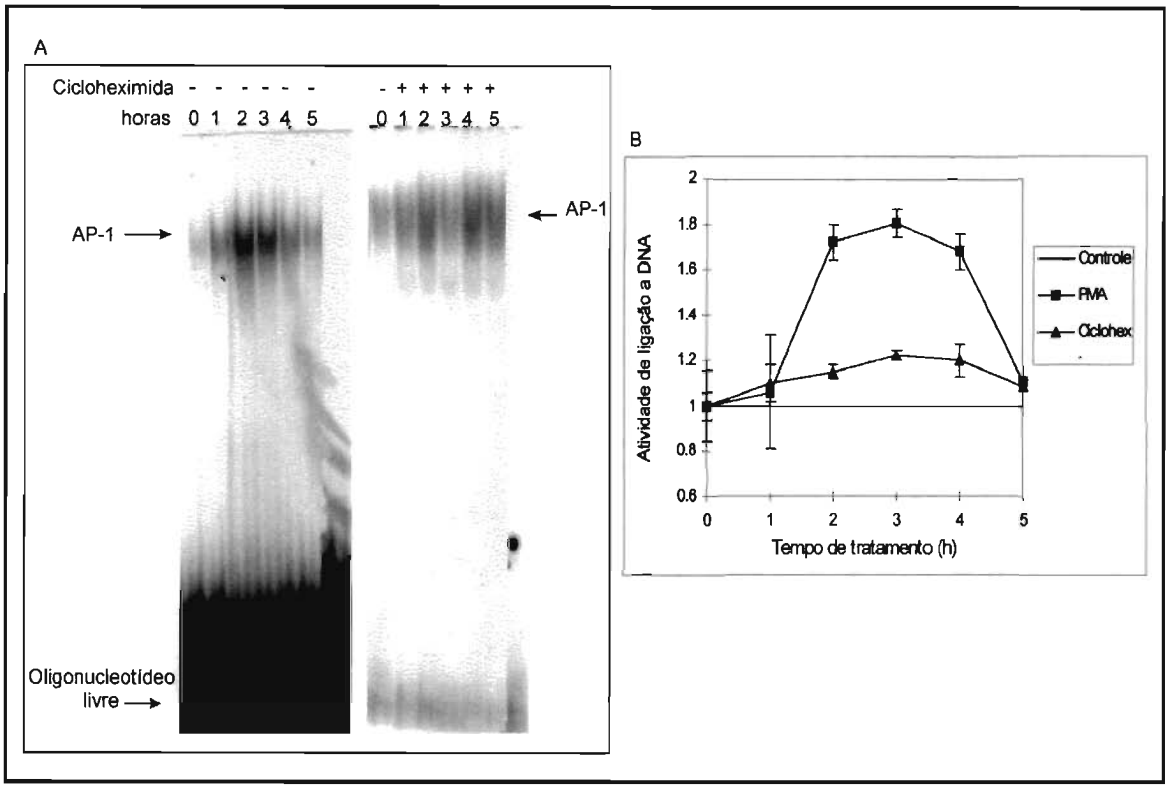
A. Autorradiograma de um experimento de retardamento de oligonucleotídeo TRE em gel de acrilamida. Células Y-1 foram tratadas com 10µg/ml Cicloheximida ou 10µg/ml Puromicina pelos períodos indicados na figura. **B**. Média da quantificação de 2 experimentos independentes de atividade de AP-1 em células tratadas com 10µg/ml Cicloheximida (Ciclohex.) e células tratadas com 10µg/ml Puromicina, controle corresponde à atividade basal de AP-1 em células em crescimento exponencial. **C**. Experimento de tomada de ^{35}S metionina em células Y-1 em crescimento exponencial por 1h, controle corresponde a incorporação de ^{35}S metionina em células em crescimento exponencial; Pur. à células tratadas com 10µg/ml Puromicina ;e Chx. à células tratadas com 10µg/ml Cicloheximida.

Figura 2: Atividade de ligação de AP-1 em TRE em células Y-1 tratadas com ACTH.



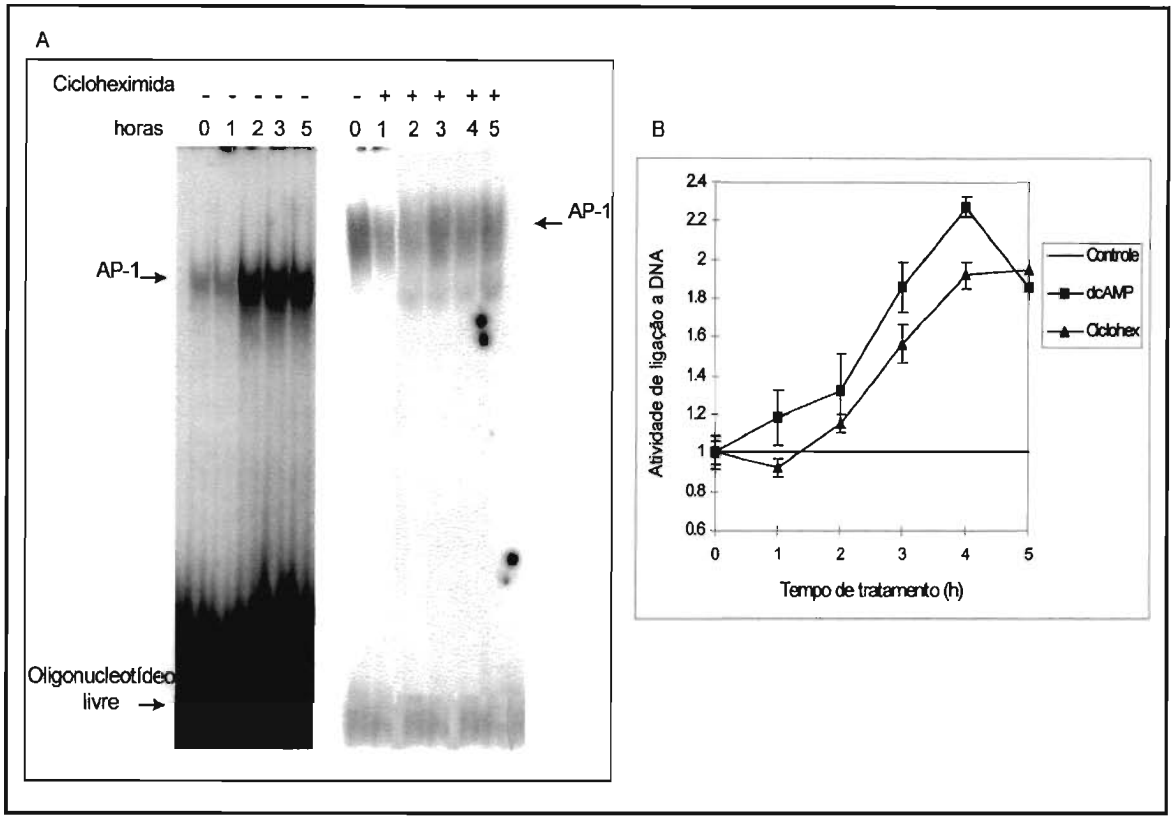
Indução da atividade de ligação de extratos nucleares de células Y-1 tratadas com 0,1U/ml ACTH ao oligonucleotídeo TRE. **A**. Experimento representativo, as condições e períodos de tratamento estão indicados na figura, as condições com Cicloheximida representam células tratadas com 10µg/ml desta droga 20 min antes da adição e mantida durante o tratamento com ACTH. **B**. Quantificação dos experimentos. Controle equivale à atividade basal de células em crescimento exponencial não tratadas, ACTH corresponde a atividade em células em crescimento exponencial tratadas com ACTH por 1h, 2h, 3h, 4h e 5h; Ciclohex. corresponde às mesmas condições de ACTH porém com células submetidas a tratamento com Cicloheximida por 20 min, antes da adição de ACTH. Os valores obtidos são a média dos valores obtidos por densitometria (área do pico de transmitância integrada) de 5 experimentos independentes no caso das condições ACTH e 3 independentes no caso de condições Cicloheximida.

Figura 3: Atividade de ligação de AP-1 em TRE em células Y-1 tratadas com PMA.



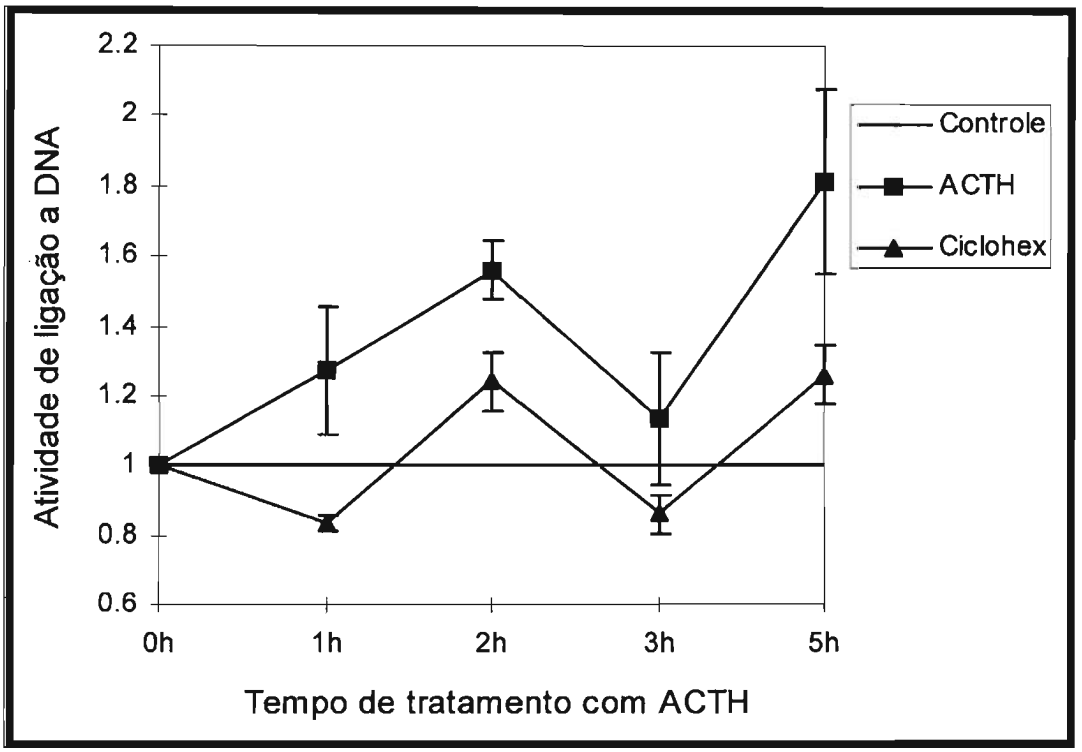
Perfil de indução da atividade de ligação de extratos nucleares de células Y-1 tratadas com 10ng/ml PMA ao oligonucleotídeo TRE. **A**. Experimento representativo, as condições e períodos de tratamento estão indicados na figura. Nas condições em que há tratamento concomitante com PMA e 10µg/ml Cicloheximida, a Cicloheximida foi adicionada 20 min antes do PMA. **B**. Quantificação dos experimentos. Controle equivale à atividade basal de células em crescimento exponencial não tratadas, PMA corresponde a atividade em células em crescimento exponencial tratadas com PMA por 1h, 2h, 3h, 4h e 5h; Ciclohex. corresponde às mesmas condições de PMA porém com células submetidas a tratamento com 10µg/ml Cicloheximida por 20 min, antes da adição de PMA. Os valores obtidos são a média dos valores obtidos por densitometria (área do pico de transmitância integrada) de 5 experimentos independentes no caso das condições PMA e 3 independentes no caso de condições Cicloheximida.

Figura 4: Atividade de ligação de AP-1 em TRE em células tratadas com dcAMP.



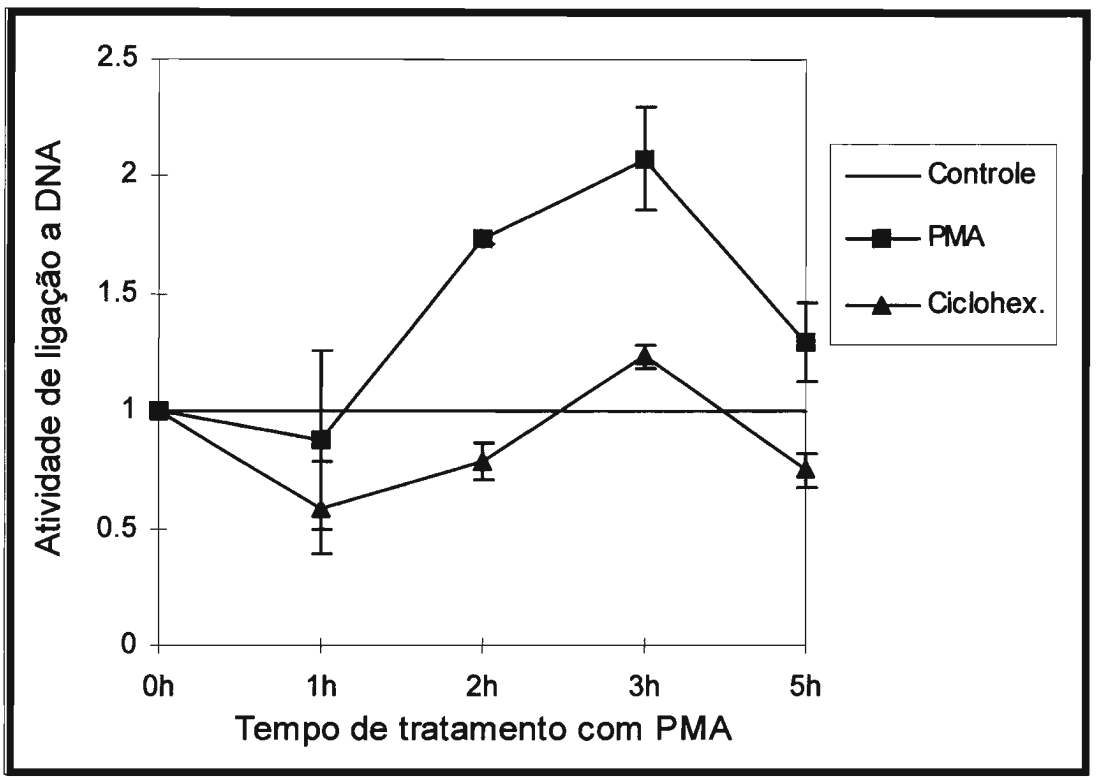
Perfil de indução da atividade de ligação de extratos nucleares de células Y-1 tratadas com 0,5mM dcAMP ao oligonucleotídeo TRE. A. Experimento representativo, as condições e períodos de tratamento estão indicados na figura. Nas condições em que há tratamento simultâneo com dcAMP e 10µg/ml Cicloheximida, o inibidor foi adicionado às células 20 min antes dos tratamentos com dcAMP. B. Quantificação dos experimentos. Controle equivale à atividade basal de células em crescimento exponencial não tratadas, dcAMP corresponde a atividade em células em crescimento exponencial tratadas com dcAMP por 1h, 2h, 3h, 4h e 5h; Ciclohex. corresponde às mesmas condições de dcAMP porém com células submetidas a tratamento com 10µg/ml Cicloheximida por 20 min, antes da adição de dcAMP. Os valores obtidos são a média dos valores obtidos por densitometria (área do pico de transmitância integrada) de 5 experimentos independentes no caso das condições PMA e 3 independentes no caso de condições Cicloheximida.

Figura 5: Atividade de ligação de AP-1 em CRE, em células tratadas com ACTH.



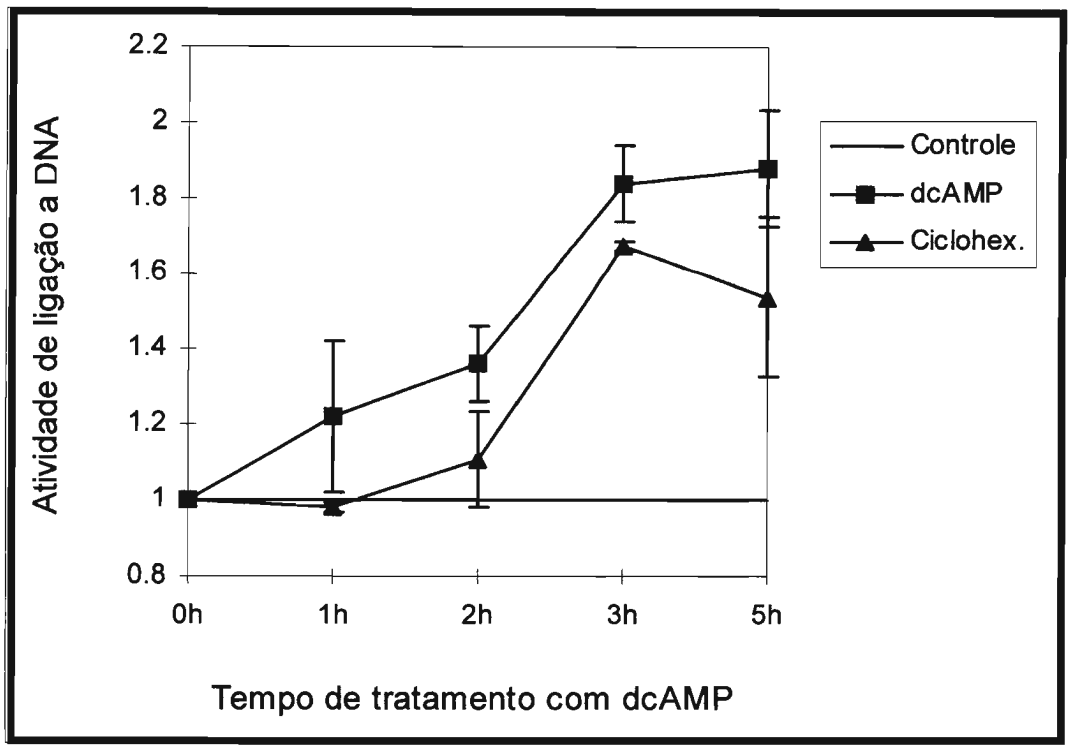
Perfil de indução da atividade de ligação de extratos nucleares de células Y-1 tratadas com 0,1 U/ml ACTH ao oligonucleotídeo CRE. Controle equivale à atividade basal de células em crescimento exponencial não tratadas, ACTH corresponde a atividade em células em crescimento exponencial tratadas com ACTH por 1h, 2h, 3h e 5h; Cicloheximida corresponde às mesmas condições de ACTH porém com células submetidas a tratamento com 10µg/ml Cicloheximida por 20 min, antes da adição de ACTH. Os valores obtidos são a média dos valores obtidos por densitometria (área do pico de transmitância integrada) de 3 experimentos independentes.

Figura 6: Atividade de ligação de AP-1 em CRE, em células tratadas com PMA.



Perfil de indução da atividade de ligação de extratos nucleares de células Y-1 tratadas com 10 ng/ml PMA ao oligonucleotídeo CRE. Controle equivale à atividade basal de células em crescimento exponencial não tratadas, PMA corresponde a atividade em células em crescimento exponencial tratadas com PMA por 1h, 2h, 3h e 5h; Ciclohex. corresponde às mesmas condições de PMA porém com células submetidas a tratamento com 10µg/ml Cicloheximida por 20 min, antes da adição de PMA. Os valores obtidos são a média dos valores obtidos por densitometria (área do pico de transmitância integrada) de 3 experimentos independentes.

Figura 7: Atividade de ligação de AP-1 em CRE em células Y-1 tratadas com dcAMP



Perfil de indução da atividade de ligação de extratos nucleares de células Y-1 tratadas com 0,5mM dcAMP ao oligonucleotídeo CRE. Controle equivale à atividade basal de células em crescimento exponencial não tratadas, dcAMP corresponde a atividade em células em crescimento exponencial tratadas com dcAMP por 1h, 2h, 3h e 5h; Ciclohex. corresponde às mesmas condições de dcAMP porém com células submetidas a tratamento com 10µg/ml Cicloheximida por 20 min, antes da adição de dcAMP. Os valores obtidos são a média dos valores obtidos por densitometria (área do pico de transmitância integrada) de 3 experimentos independentes.

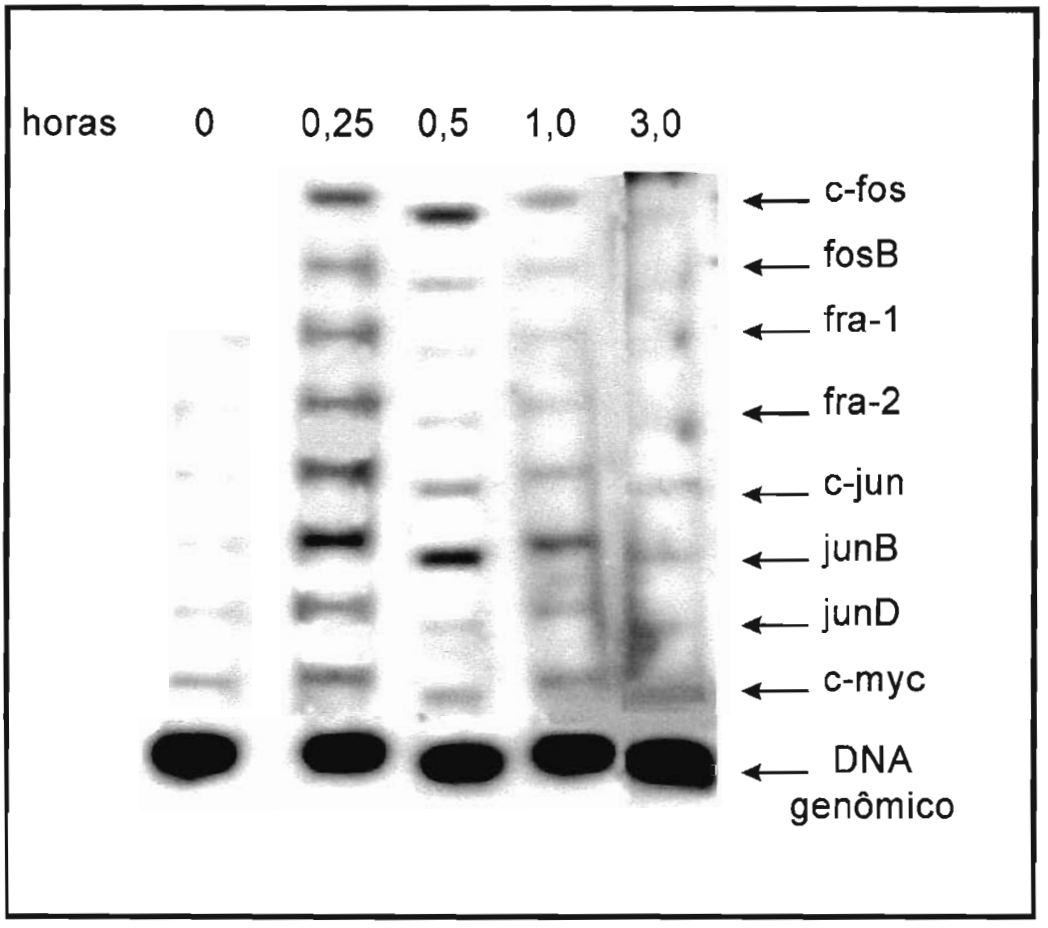
Transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1

Os níveis de transcrição dos referidos genes em células Y-1 foi analisada a partir de ensaios de elongação de cadeia nascente de RNA (run off transcription). A análise destes resultados mostra que em células carenciadas, praticamente todos os genes sofrem indução de transcrição, ainda que pequena. Os genes cuja transcrição é diferencialmente regulada são c-fos, c-jun, junB e c-myc. FCS e PMA são fortes indutores destes 4 genes, enquanto que ACTH é forte indutor de c-fos, c-jun e junB e dcAMP é forte indutor apenas de c-fos e junB.

Estes resultados estão representados nas figuras 8, 9, 10 e 11.

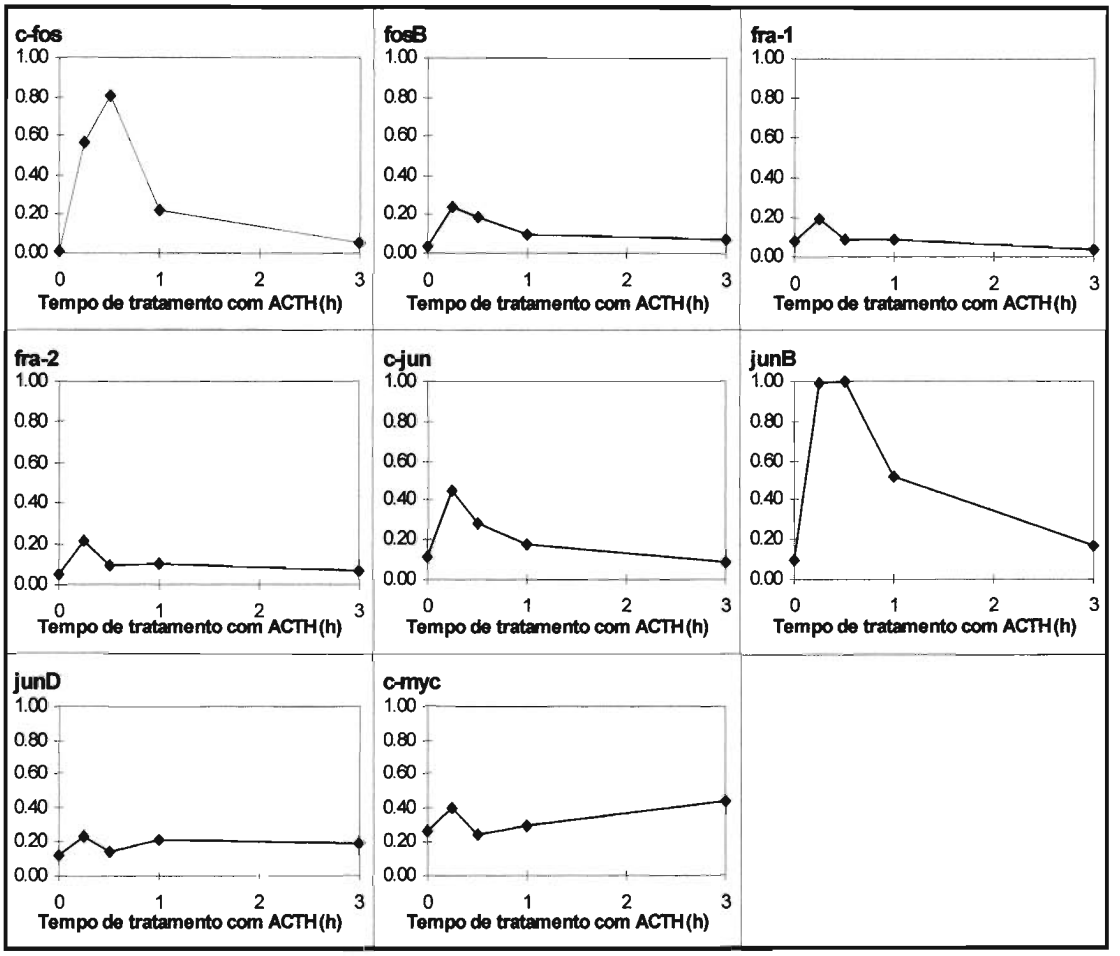
Figura 8: Cinética da indução de transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1 carenciadas e estimuladas com ACTH.

A.



A. Autorradiograma de um experimento de elongação de cadeia nascente de RNA. Núcleos isolados de células Y-1 carenciadas e estimuladas com 0,1U/ml ACTH foram submetidos ao ensaio de elongação conforme descrito.

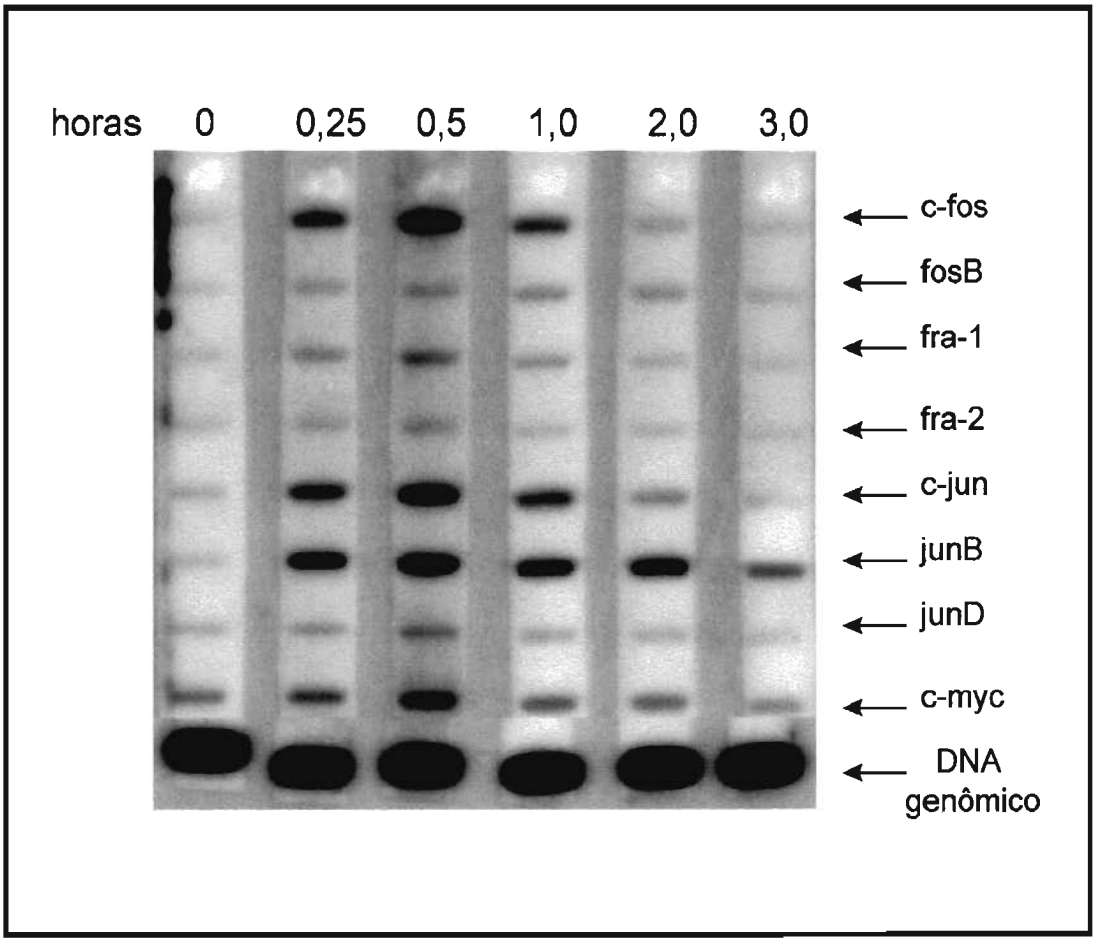
B.



B. Quantificação do autorradiograma apresentado em A. As ordenadas representam a velocidade de transcrição relativa de cada gene, obtida a partir de densitometria do filme de raio X. Os valores representados foram calculados conforme especificado em Materiais e Métodos. Os resultados de indução de transcrição de c-fos e junB são significativos, segundo o teste de χ^2, para α=0,01, também descrito em Materiais e Métodos.

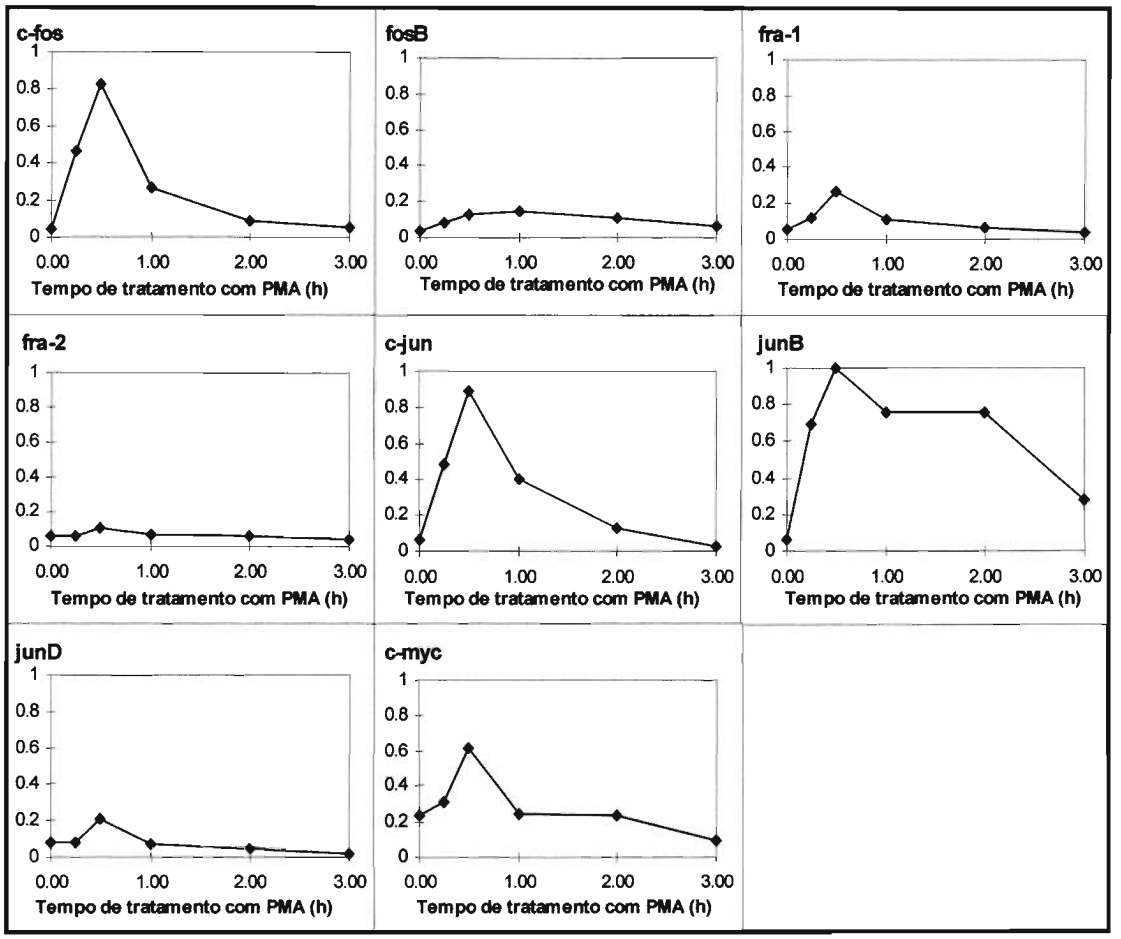
Figura 9: Cinética da indução de transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1 carenciadas e estimuladas com PMA.

A.



A. Autorradiograma de um experimento de elongação de cadeia nascente de RNA em células Y-1 carenciadas e estimuladas com 10ng/ml PMA.

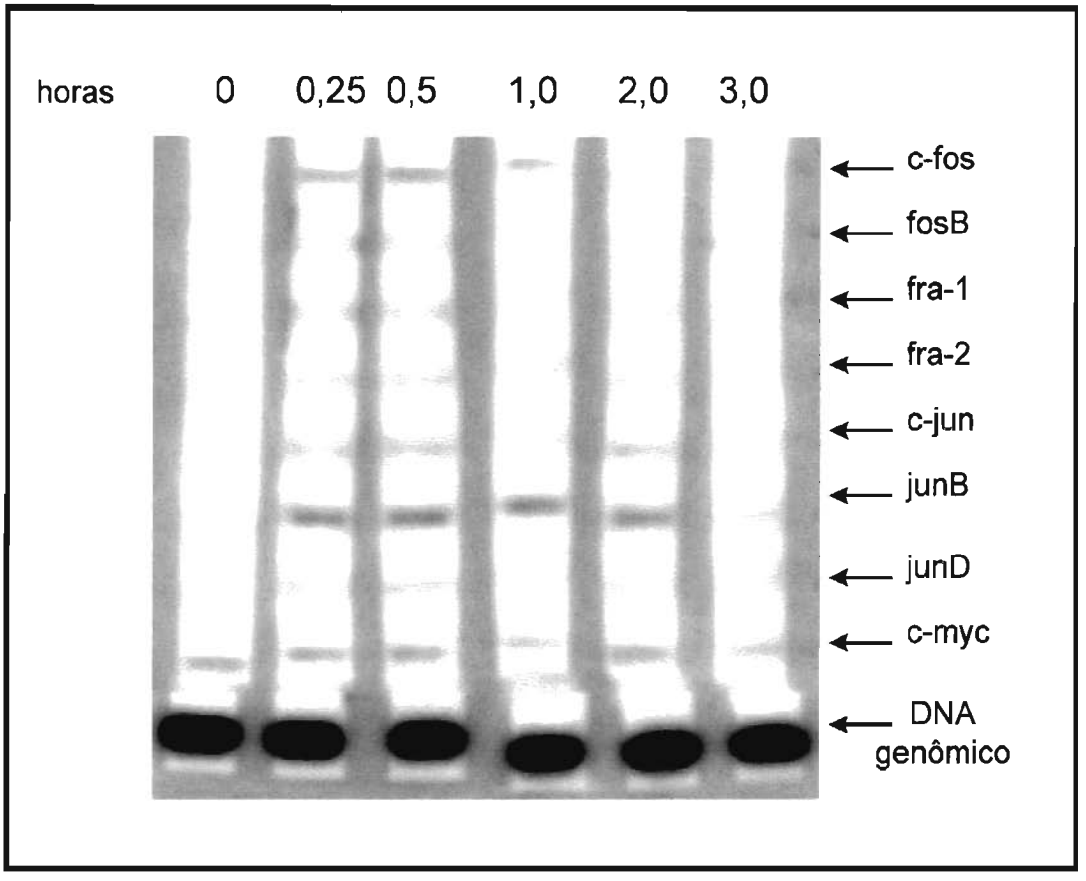
B.



B. Quantificação do autorradiograma apresentado em A. As ordenadas representam a velocidade de transcrição relativa de cada gene, obtida a partir de densitometria do filme de raio X. Os valores representados foram calculados conforme especificado em Materiais e Métodos. Os resultados de indução de transcrição de c-fos, c-jun e junB são significativos segundo o teste de χ^2, para α=0,01.

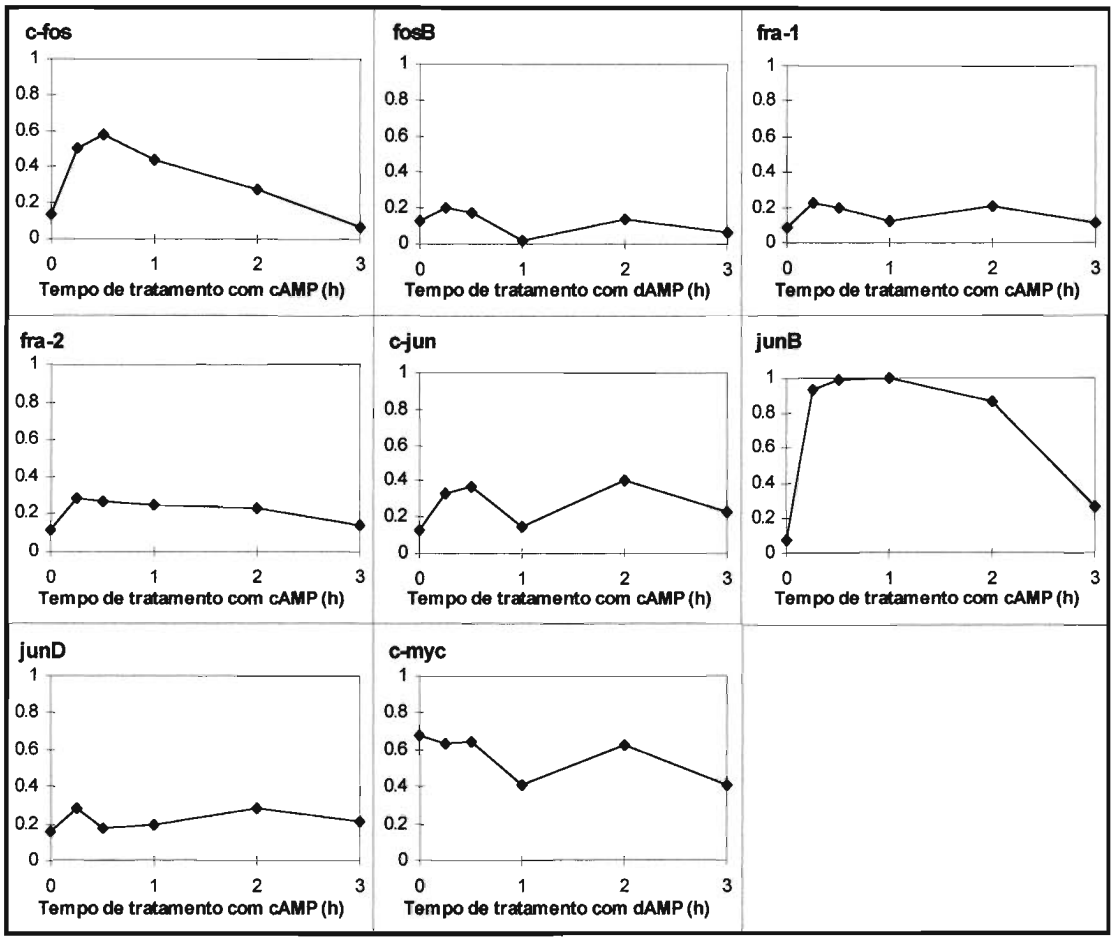
Figura 10: Cinética da indução de transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1 carenciadas e estimuladas com dcAMP.

A.



A. Autorradiograma de um experimento de elongação de cadeia nascente de RNA em células Y-1 tratadas com 0,5mM dcAMP.

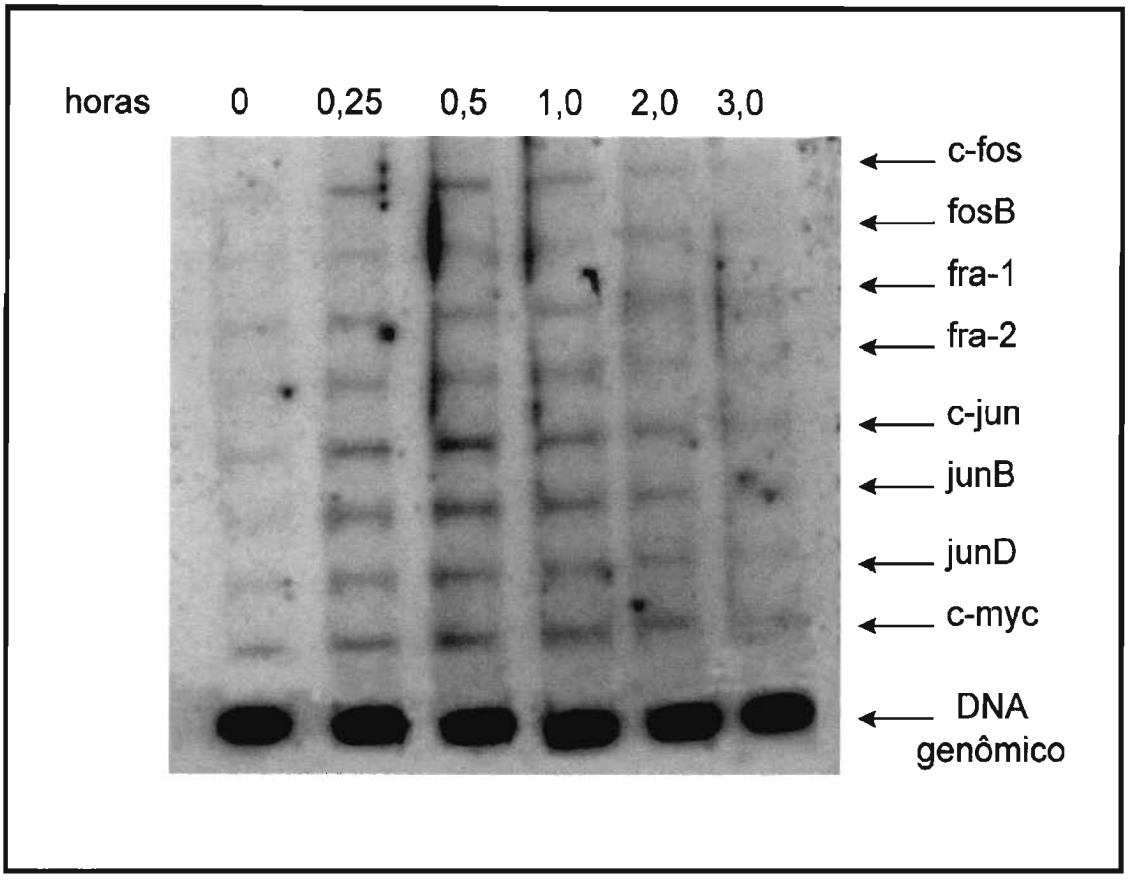
B.



B. Quantificação do autorradiograma apresentado em A. As ordenadas representam a velocidade de transcrição relativa de cada gene, obtida a partir de densitometria do filme de raio X. Os valores representados foram calculados conforme especificado em Materiais e Métodos. Os resultados de indução de transcrição de junB, são significativos, segundo o teste de χ^2, com α=0,01.

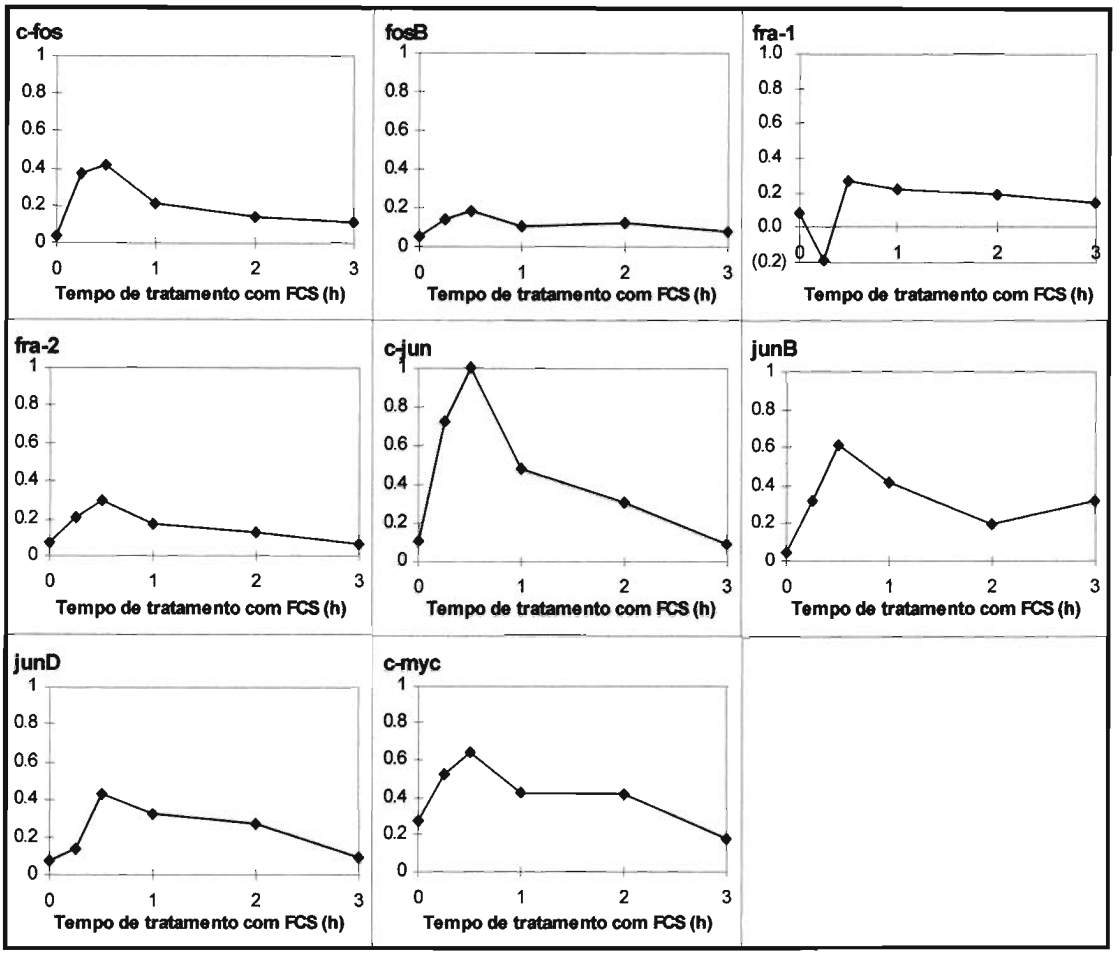
Figura 11: Cinética da indução de transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1 carenciadas e estimuladas com FCS.

A.



A. Autorradiograma de um experimento de elongação de cadeia nascente de RNA em células Y-1 tratadas com 10% FCS.

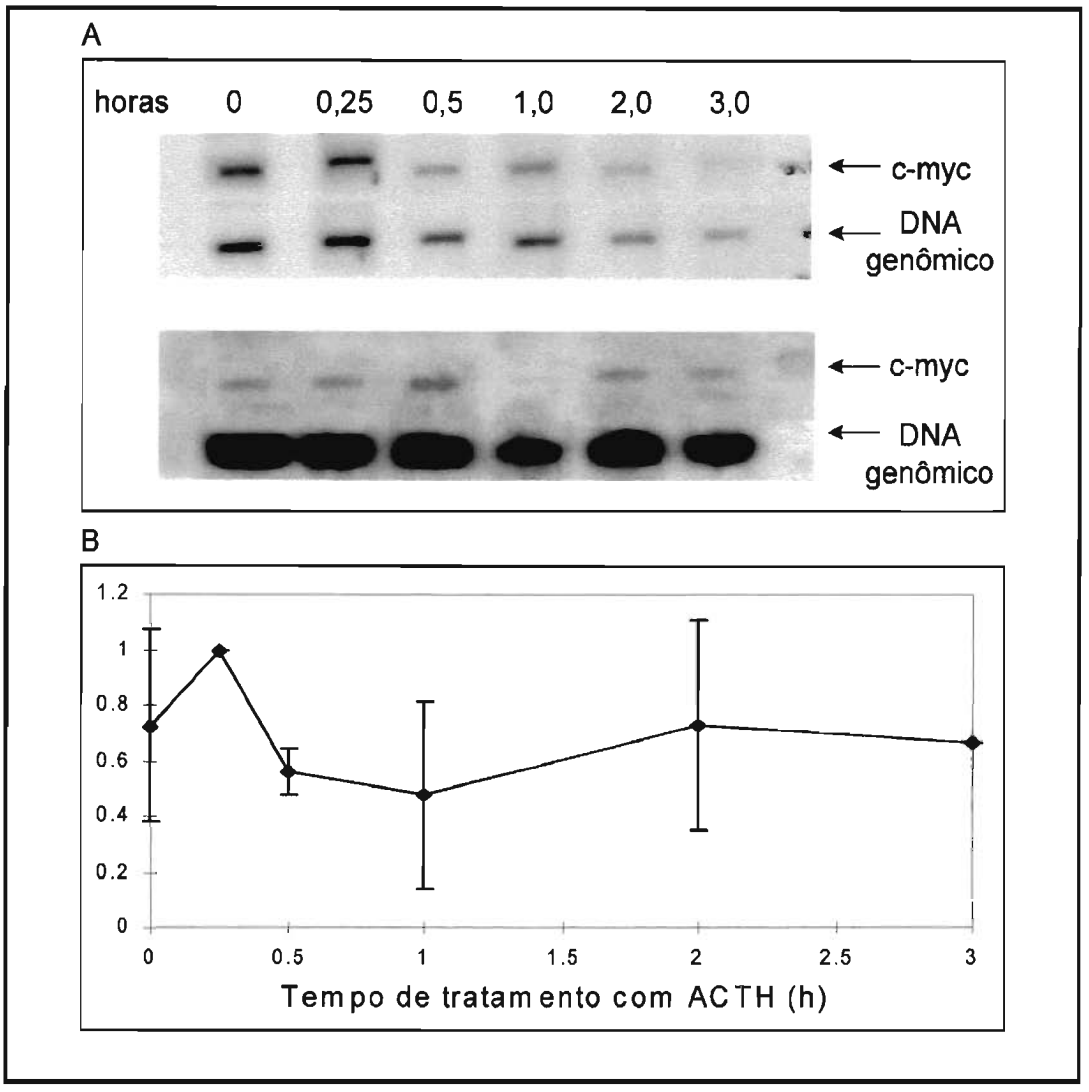
B.



B. Quantificação do autorradiograma apresentado em A. As ordenadas representam a velocidade de transcrição relativa de cada gene, obtida a partir de densitometria do filme de raio X. Os valores representados foram calculados conforme especificado em Materiais e Métodos. Os resultados de indução de transcrição de c-fos, c-jun e junB são significativos, segundo o teste de χ^2, para α=0,01.

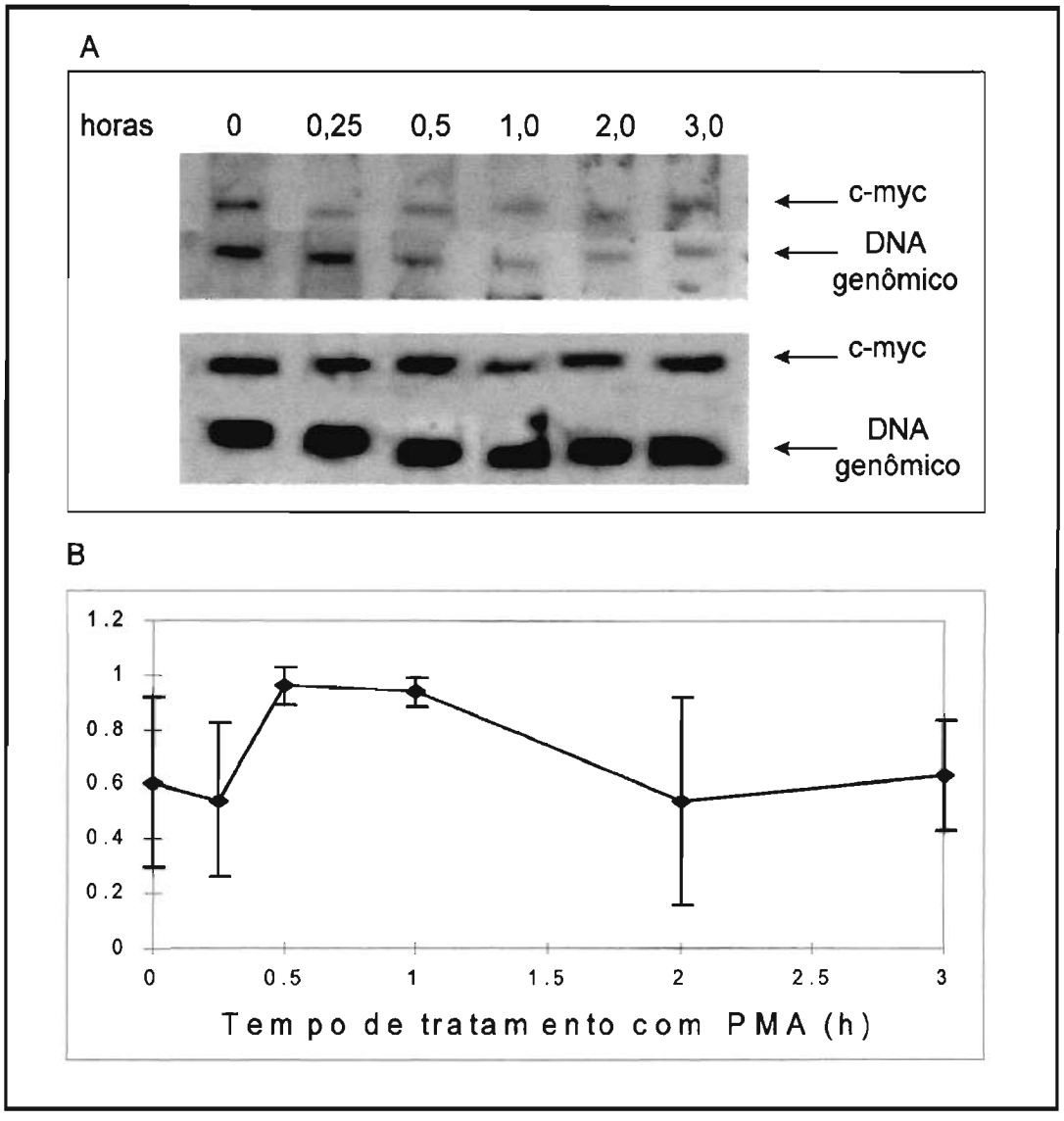
Examinamos também os níveis de transcrição de c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial. As figuras 12, 13 e 14 mostram os resultados obtidos a partir dos experimentos de elongação de cadeia nascente de RNA em células estimuladas com ACTH, PMA e dcAMP. Estes resultados nos mostram que os tratamentos não induzem alterações significativas nos níveis de transcrição de c-myc em células em crescimento exponencial.

Figura 12: Níveis de transcrição do proto-oncogene c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial estimuladas com ACTH.



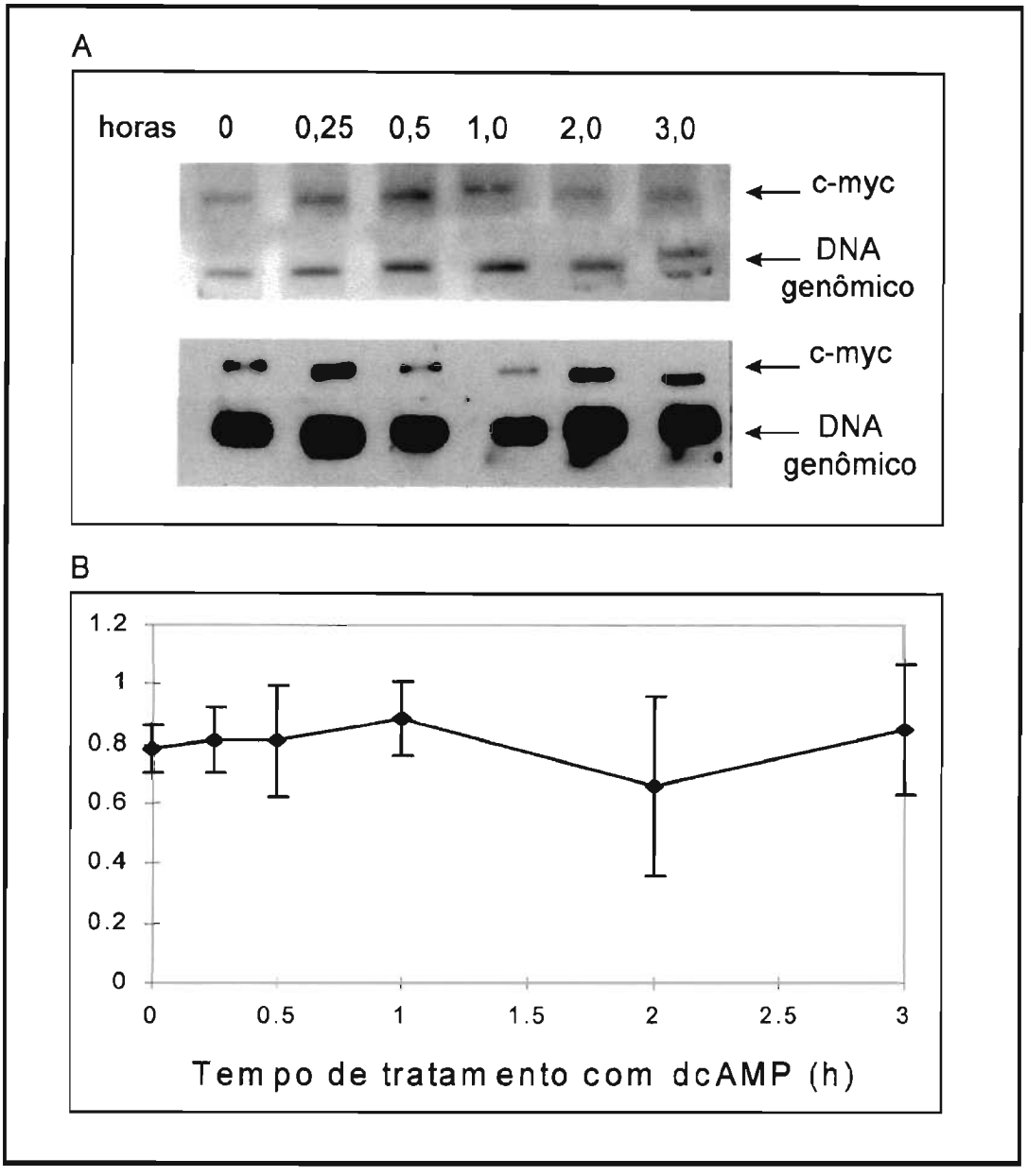
A. Autorradiogramas de 2 experimentos de ensaio de elongação de cadeia nascente de RNA em células Y-1 em crescimento exponencial tratadas com 0,1U/ml ACTH. **B**. Quantificação dos autorradiogramas apresentados em A. Na ordenada está representada a média das velocidades de transcrição relativas obtidas a partir de densitometria dos filmes de raio X. As variações de nível de transcrição foram dadas como insignificantes de acordo com o teste ANOVA: Fator Único, com 3 graus de liberdade e α=0,01.

Figura 13: Níveis de transcrição do proto-oncogene c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial estimuladas com PMA.



A. Autorradiogramas de 2 experimentos de ensaio de elongação de cadeia nascente de RNA em células Y-1 em crescimento exponencial tratadas com 10ng/ml PMA. **B**. Quantificação dos autorradiogramas apresentados em A. Na ordenada está representada a média das velocidades de transcrição relativas obtidas a partir de densitometria dos filmes de raio X. As variações de nível de transcrição foram dadas como insignificantes de acordo com o teste ANOVA: Fator Único, com 4 graus de liberdade e α=0,01.

Figura 14: Níveis de transcrição do proto-oncogene c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial estimuladas com dcAMP.



A. Autorradiogramas de 2 experimentos de ensaio de elongação de cadeia nascente de RNA em células Y-1 em crescimento exponencial tratadas com 0,5mM dcAMP. **B**. Quantificação dos autorradiogramas apresentados em A. Na ordenada está representada a média das velocidades de transcrição relativas obtidas a partir de densitometria dos filmes de raio X. As variações de nível de transcrição foram dadas como insignificantes de acordo com o teste ANOVA: Fator Único, com 4 graus de liberdade e α=0,01.

Níveis de mRNA dos proto-oncogenes fos e jun em células Y-1 carenciadas, detectados por hibridizações tipo Northern

A figura 15 mostra as cinéticas de degradação do mRNA de c-fos em células Y-1 carenciadas e estimuladas com ACTH e PMA. Após estimuladas, as células foram tratadas com ActinomicinaD para bloquear a síntese de RNA. Observamos nesta figura que a meia-vida do transcrito de c-fos é de 35 min em células tratadas com ACTH e 28,8 min em células tratadas com PMA, ou seja, a meia vida dos transcritos de c-fos em células tratadas com PMA é 27% menor que a meia vida dos transcritos de c-fos em células tratadas com ACTH. Os sinais de transcritos de c-fos em células Y-1 tratadas com dcAMP estiveram abaixo dos níveis de detecção e quantificação.

A figura 16 mostra a cinética de degradação de c-jun em células Y-1 carenciadas, estimuladas com PMA e após 1h, tratadas com ActinomicinaD por períodos variados.

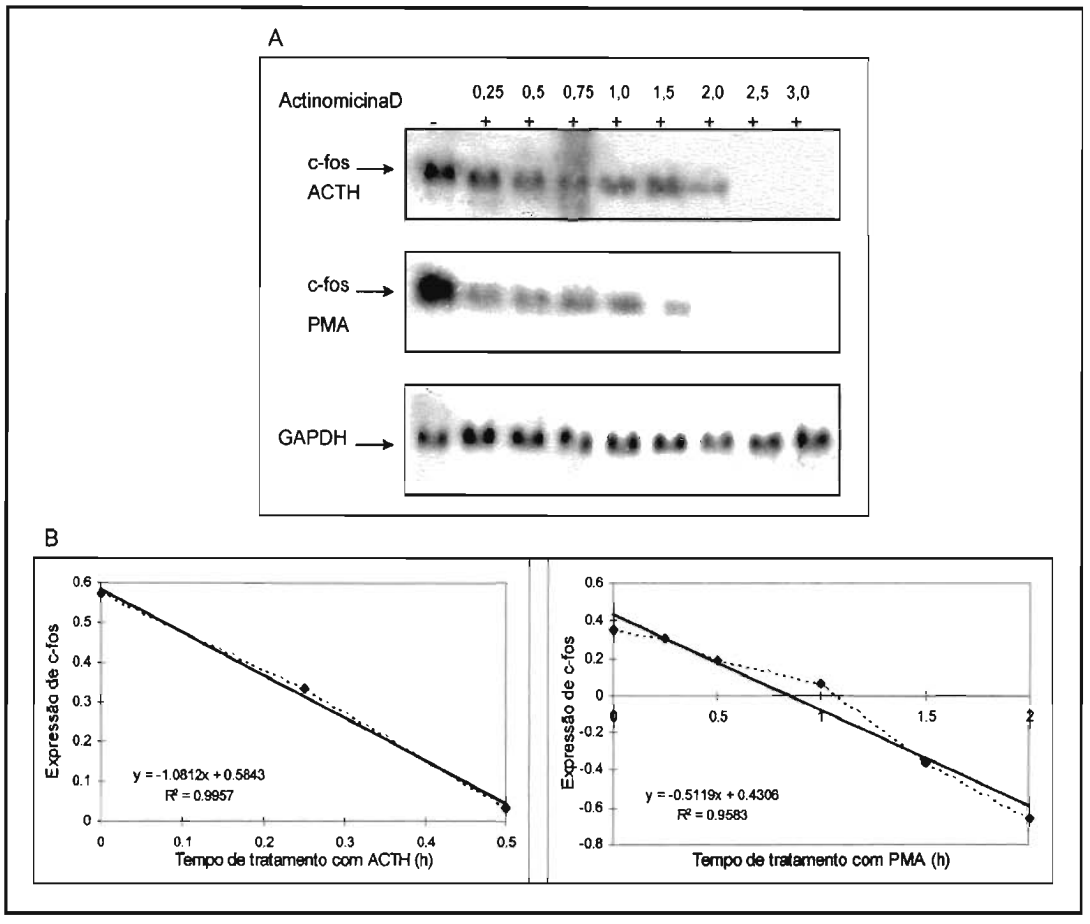
Na figura 17 são apresentadas as estimativas dos níveis de mRNA de fosB de células tratadas com ActinomicinaD além de ACTH. Nota-se um acentuado aumento dos níveis de mRNA causado pelo tratamento com ActinomicinaD, seguido de progressiva redução. Nesta fase de redução foi possível fazer uma estimativa da meia-vida do mRNA de fosB, determinada em 31 min.

A figura 18A mostra que ActinomicinaD inibe 97% da incorporação de ^{3}H uridina em RNA em células Y-1, indicando que nestas condições há um eficiente bloqueio da transcrição. Por outro lado, a figura 18B mostra que tratamento prévio com ActinomicinaD elimina a indução de fosB por ACTH, PMA e dcAMP, em células Y-1, coerente com a idéia de bloqueio de transcrição. Portanto o efeito "superindutivo" de ActinomicinaD sobre o mRNA de fosB, quando adicionada após 1h ou 2h de ACTH, em células Y-1 (conforme mostrado na figura 17), deve-se, necessariamente, a mecanismos pós-transcricionais.

Cabe assinalar que ActinomicinaD não tem efeito "indutivo" sobre a expressão de fosB em células não estimuladas, o que se explicaria por níveis

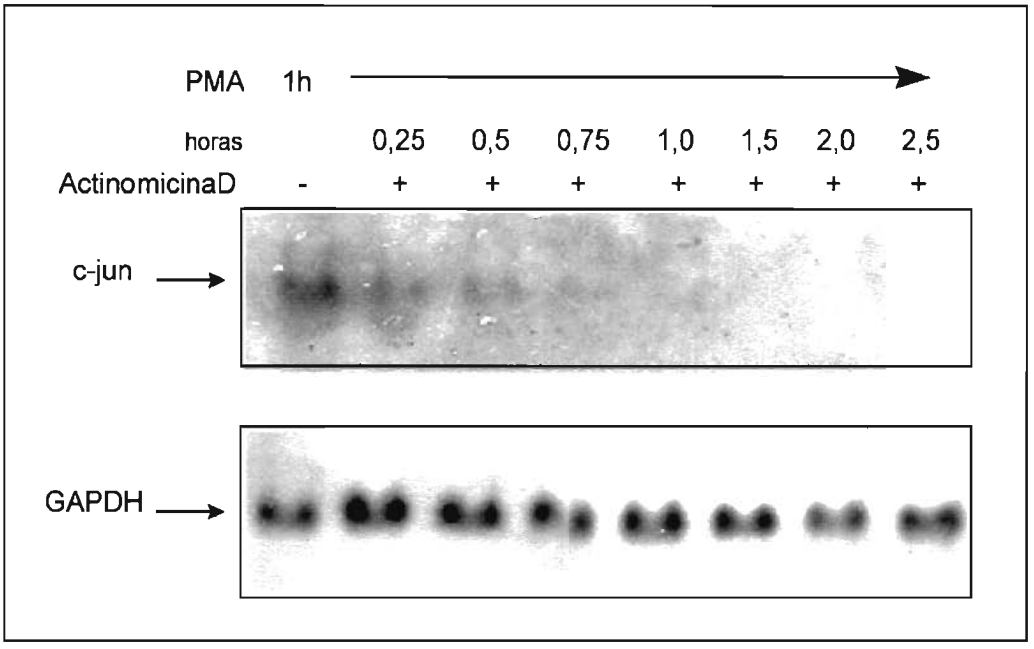
muito baixos do mRNA nestas condições, ou porque este efeito só aparece na presença de indutores como ACTH e PMA.

Figura 15: Determinação da meia-vida com mRNA de c-fos em células Y-1 carenciadas e estimuladas com ACTH e PMA.



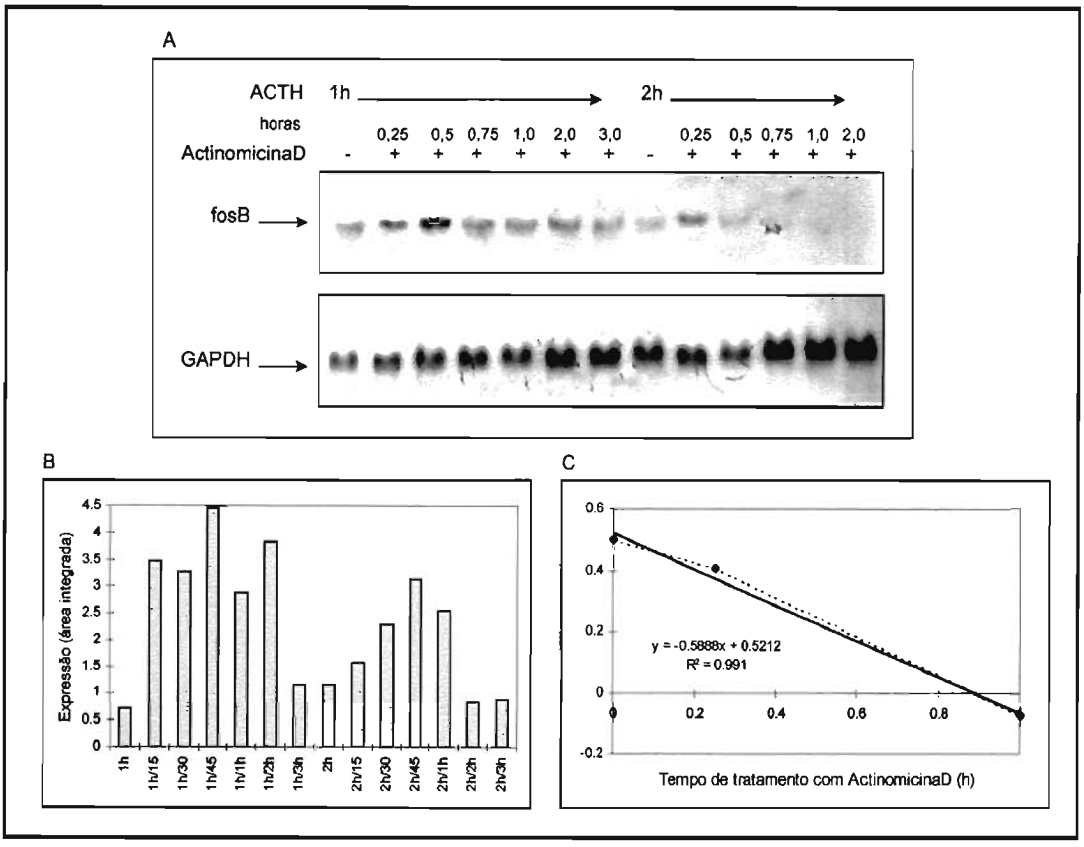
A. Autorradiogramas de hibridizações de Northern blot com sondas de c-fos e GAPDH. A primeira hibridização foi feita com células tratadas com 0,1U/ml ACTH por 1h seguido de tratamento com 5µg/ml ActinomicinaD pelo tempos indicados. A segunda hibridização foi feita com células tratadas com 10ng/ml PMA por 1h, seguido de tratamento com ActinomicinaD conforme indicado. **B**. Quantificação dos autorradiogramas apresentados em A. Os 2 gráficos têm como tempo 0 1h de tratamento com ACTH ou PMA e os tempos seguintes correspondem a tratamento concomitante com ActinomicinaD. As ordenadas mostram o logaritmo do valor obtido por densitometria dos filmes de raio X.

Figura 16: Cinética de degradação do mRNA de c-jun em células tratadas com PMA e posteriormente com ActinomicinaD.



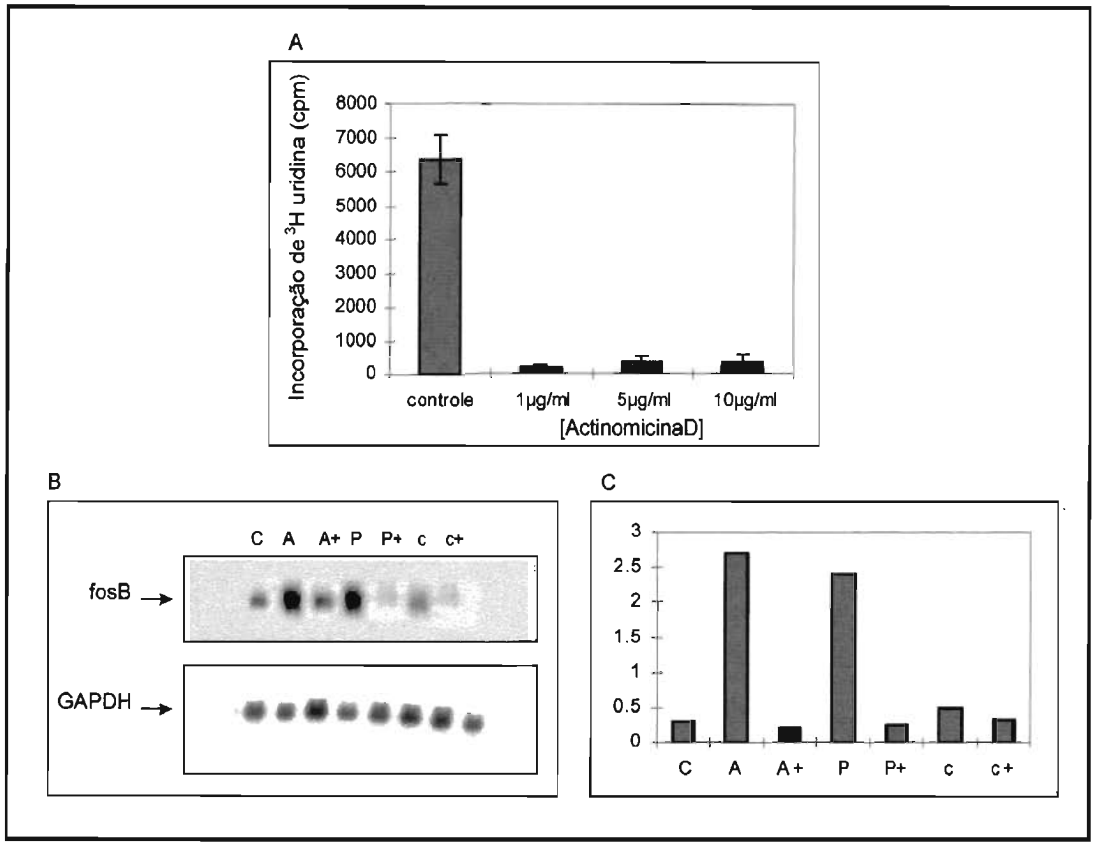
Autorradiograma de um Northern blot hibridizado com sondas de c-jun e GAPDH. Os RNAs foram extraídos de células Y-1 carenciadas, estimuladas com 10ng/ml PMA por 1h e em seguida tratadas com 5µg/ml ActinomicinaD pelos tempos indicados na figura em horas. A meia-vida de c-jun foi determinada, semi-quantitativamente, em 30 min.

Figura 17: Meia-vida do mRNA de fosB em células Y-1 carenciadas e estimuladas com ACTH e posteriormente tratadas com ActinomicinaD.



A. Autorradiograma de um Northern blot hibridizado com sonda de fosB e GAPDH. O RNA foi extraído de células carenciadas e estimuladas com 0,1U/ml ACTH por 1h ou 2h, em seguida a estes tratamentos, adicionou-se às células 5µg/ml ActinomicinaD e coletou-se nos tempos especificados na figura em horas. **B**. Quantificação do autorradiograma apresentado em A, a ordenada mostra os valores absolutos da quantificação do filme de raio X. **C**. Determinação da meia-vida de fosB, a partir dos valores correspondentes a tratamento com ACTH por 2h, seguido de ActinomicinaD por 45 min, 1h e 2h.

Figura 18: Testes de atividade de ActinomicinaD em células Y-1.



A. Ensaio de dose-resposta a ActinomicinaD em células Y-1. As células foram tratadas com 1µg/ml, 5µg/ml ou 10µg/ml de ActinomicinaD por 15min e então receberam 5µCi/ml H^3 uridina por 30min, controle corresponde a células não tratadas. O radioativo incorporado foi dosado por cintilação, plotado no eixo Y em cpm. **B**. Autorradiograma de um Northern blot hibridizado com sonda de fosB e GAPDH. C corresponde à condição controle, A, P e c, células tratadas com 0,1U/ml ACTH, 100 ng/ml PMA e 0,5mM dcAMP por 1h, A+, P+ e c+, a células tratadas com 5µg/ml ActinomicinaD por 15 min antes dos tratamentos citados acima. **C**. Quantificação do autorradiograma, a legenda corresponde às mesmas condições de B.

V. Discussão

Atividade de AP-1 em células Y-1

Os resultados mostram que há, em células Y-1 em crescimento exponencial, um nível basal de atividade de AP-1, cujos valores aumentam significantemente em células tratadas com ACTH, PMA e dcAMP. Este aumento não surpreende uma vez que ACTH e PMA induzem os genes fos e jun e levam ao aumento das proteínas Fos e Jun.

No entanto, o aumento de atividade de AP-1 não é conseqüência do aumento da concentração das proteínas Fos e Jun causado pela indução dos respectivos genes por ACTH e PMA. Isto porque: a) tratamento com Cicloheximida leva a uma acentuada redução nos níveis basais de atividade de AP-1, b) tratamento concomitante de ACTH, PMA ou dcAMP com Cicloheximida é capaz de ativar AP-1.

Portanto, a modulação da atividade de AP-1 é complexa. Assim, a indução dos genes fos e jun permite mudança da composição relativa do estoque de proteínas Fos e Jun e também dos níveis de concentração total. Há ativação do complexo ao nível das proteínas. E finalmente, a alta sensibilidade da atividade de AP-1 à inibição da síntese protéica, sem que isto possa ser explicado pela redução da concentração das proteínas, sugerem um mecanismo refinado pós traducional regulando atividade deste grupo de fatores de transcrição.

Observamos também que os resultados obtidos em reações com o oligonucloetídeo CRE são bastante semelhantes aos obtidos com o oligonucleotídeo TRE. Sabe-se que os complexos AP-1 reconhecem e ligam em sequências CRE (Ryseck & Bravo, 1991), dependendo da composição do dímero e também das regiões flanqueadoras da sequência CRE consenso. Não apenas isso, fatores de transcrição CREB também ligam-se a sequências TRE, sendo que alguns autores sugerem que os fatores de transcrição AP-1 e CREB/ATF poderiam ser classificados em apenas uma super-família de fatores de transcrição (Masquilier & Sassone-Corsi, 1992; Hai & Curran, 1991; Sassone-Corsi et al, 1990). Sabe-se também que as proteínas Jun formam dímeros com CREB (CRE Binding Protein) e estes dímeros podem

reconhecer tanto sequências AP-1 quanto sequências CRE (DeCesare et al, 1995; Dorsey et al, 1995).

CREB/ATF é uma família de fatores de transcrição cuja atividade é modulada por fosforilação pela subunidade catalítica de PKA. As proteínas do fator AP-1, Fos e Jun, são reguladas a nível de expressão dos mRNAs e proteínas e a nível de modificações pós-traducionais, principalmente fosforilação. A principal via conhecida pela qual há indução da transcrição e atividade das proteínas de AP-1 é a via Raf/MAP quinases. Esta via é ativada por Ras e também por PKC.

Os resultados de indução da atividade de AP-1 em células Y-1 sugerem que tratamento com dcAMP, que obrigatoriamente ativa a via de PKA, deve promover indução da atividade de AP-1 por ativação de CREB que estaria reconhecendo elementos TRE e CRE, ou ainda por fosforilação de complexos AP-1 já formados embora não se saiba se PKA fosforila outros fatores de transcrição que não os da família CREB/ATF. PMA obrigatoriamente ativa a via de PKC, que por sua vez ativa a cascata de MAP quinases que levam à expressão dos proto-oncogenes fos e jun promovendo aumento da atividade de AP-1 (Burgering & Bos, 1995). Vale lembrar que a via de MAP quinases não só promove transcrição de fos e jun como também promove fosforilação de resíduos de serina das proteínas aumentando a atividade do complexo AP-1, independentemente de síntese de proteína. ACTH apresenta efeito semelhante ao de PMA.

O receptor de ACTH é um receptor capaz de ativar proteína G e muito provavelmente a via de MAP quinases (não só pela estrutura do receptor, mas também por induzir transcrição dos proto-oncogenes fos e jun), neste caso, a via de MAP quinases promoveria expressão de Fos e Jun e também fosforilação do complexo AP-1 aumentando a sua atividade. Sabe-se também que ACTH ativa a via de PKA, sendo capaz portanto de ativar, em células Y-1, vias de transdução de sinal diferentes mas que podem se cruzar ou convergir para um ponto em comum.

Corrobora a idéia de ativação de vias que podem convergir para um mesmo ponto, resultados obtidos no laboratório com um clone mutante de Y-1 PKA^-, onde ACTH não é capaz de induzir expressão de fosB, PMA é capaz de

induzir pequena expressão de fosB, mas tratamento simultâneo com ACTH e PMA tem efeito sinergístico sobre a indução de fosB, mostrando que há uma colaboração entre a ação de ACTH e PMA sobre a indução de fosB.

Cinética de indução da transcrição dos proto-oncogenes fos, jun e c-myc em células Y-1

Observamos em alguns casos, que há transcrição de genes mesmo em células carenciadas, chamamos esta condição de nível basal de transcrição. No caso, c-myc e junD apresentam níveis basais altos, uma vez que são constitutivamente expressos (referência à transcrição gênica), apesar de serem estimulados por alguns tratamentos. No caso dos outros genes das famílias fos e jun o nível basal de transcrição é tão pequeno que se confunde com o "background" do filme, tornando imprecisas as medidas nestas condições.

A nível de transcrição, os genes que se destacam por serem diferencialmente expressos são c-fos, c-jun, junB e c-myc. Os resultados mostram que junB é o gene melhor induzido por ACTH, PMA e dcAMP, enquanto que c-jun é o gene melhor induzido por soro (FCS). c-fos é bem induzido por ACTH e PMA, mas também é induzido por dcAMP e soro, em uma escala menor. c-myc é bem induzido por soro e PMA, mas não por dcAMP e ACTH. A análise estatística destes resultados, mostra que os resultados de indução de c-myc por FCS e PMA, de c-fos por dcAMP não são significativos, porém observa-se, pelo menos qualitativamente que há indução da transcrição nestes casos. Devemos relembrar o fato desta análise ter sido feita sobre um resultado único, sendo uma análise preliminar.

O restante dos genes analisados apresentam pequena indução em tempos curtos de tratamento com todos os fatores utilizados.

A regulação de c-myc.

Células em crescimento exponencial apresentam expressão constitutiva de c-myc que não é alterada pelos tratamentos utilizados, sugerindo que o controle de transcrição de c-myc neste caso está bastante relaxado. O teste ANOVA: Fator Único, mostra que as variações observadas não são significativas.

Trabalhos anteriores do laboratório, descritos na Introdução, mostram que tratamento com ACTH e dcAMP promovem diminuição da expressão de c-myc em células carenciadas, provavelmente, esta diminuição é devida a um grande aumento da instabilidade do transcrito, uma vez que não há bloqueio da transcrição, ou ainda a transcrição pode ser abortiva e não gerar um transcrito detectável. Dados da literatura descrevem este tipo de regulação na expressão de c-myc (Krumm et al, 1995; Eick et al, 1994).

No caso de células carenciadas, observamos que há transcrição basal de c-myc relativamente alta, principalmente se compararmos vários modelos de células normais descritos por vários grupos onde o carenciamento promove total bloqueio da expressão de c-myc. Porém este basal é aumentado, qualitativamente, por tratamentos com soro e PMA, enquanto que tratamentos com ACTH e dcAMP não têm efeito sobre a transcrição de c-myc. Estes resultados mostram-se de acordo com dados anteriores, onde ACTH e dcAMP inibem expressão de c-myc e PMA aumenta a expressão de c-myc em células Y-1 em crescimento exponencial.

Regulação dos níveis dos mRNAs dos proto-oncogenes fos e jun

O uso de ActinomicinaD reafirmou a importância do controle de transcrição na regulação dos níveis de mRNA dos genes fos e jun.

Primeiro, tratamento prévio com ActinomicinaD elimina a indução de fosB por ACTH e PMA. Segundo, a meia-vida dos mRNAs de c-fos e c-jun foram estimadas em aproximadamente 30 min, sugerindo que a velocidade de degradação não é importante no controle dos níveis destes mRNAs. Terceiro,

observamos um efeito "superindutivo" de ActinomicinaD sobre o mRNA de fosB. Este efeito, que já foi descrito por outros grupos para mRNAs das famílias fos e jun e também de outros proto-oncogenes (Chen & Shyu, 1994; Schiavi et al, 1992); parece ser artefactual ao promover a redução da velocidade da degradação do mRNA embora seja um efeito indicador da ocorrência de mecanismos pós-transcricionais relevantes na transmissão da informação genética do gene à proteína, ainda não esclarecidos. A hipótese levantada para explicar este efeito, por este grupo, foi a de que, sequências específicas do mRNA seriam reconhecidas por proteínas que são translocadas do núcleo para o citoplasma quando a célula é tratada com inibidores de transcrição, estas proteínas são capazes de estabilizar o transcrito por competirem com outras que sinalizariam, ou iniciariam a degradação do mesmo.

É interessante notar que ActinomicinaD diferencia os mRNAs de c-fos e fosB quanto à degradação.

IV. Conclusões

1. ACTH, PMA e dcAMP são capazes de promover aumento da atividade de AP-1 em células Y-1, independentemente de síntese de proteínas. Há uma regulação complexa a nível pós-traducional, onde devem contar a concentração e qualidade do estoque de proteínas Fos e Jun, a ativação destas e a interação com outros fatores de transcrição, por exemplo CREB/ATF.

2. Em células carenciadas, ACTH, PMA, dcAMP e FCS são cap
induzir transcrição dos genes das famílias fos e jun, principalmente c-fc
e junB.

3. A degradação dos transcritos de c-fos e fosB apresentam respostas diferentes a tratamento com ActinomicinaD, sugerindo mecanismos de regulação pós-transcricionais diferentes para cada um destes genes, embora, a degradação dos mRNAs de c-fos e c-jun não pareça ser um passo importante na regulação da expressão destes genes.

4. O controle de transcrição de c-myc é relaxado em células Y-1. A transcrição é constitutiva em células em crescimento exponencial, enquanto que em células carenciadas tratadas com PMA e FCS, observa-se indução qualitativa da transcrição sobre um basal relativamente alto.

5. Provavelmente observamos regulação por interrupção da transcrição, ou por grande aumento da instabilidade do mRNA, no caso de células em crescimento exponencial, onde tratamento com ACTH não altera a transcrição de c-myc, apesar de diminuir o nível de mRNA.

VII. Referências Bibliográficas

Andrews, N.A. & Faller, D.V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucl. Acids Res., 19: 2499.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell, 49: 729-739.

Armelin, H.A. (1975). Hormones and regulation of cell division: mammalian cell cultures as na experimental approach. In: Biochemical Actions of Hormones. G. Litwack, Ed., Academic Press, New York.

Armelin, H.A. & Armelin, M.C.S. (1987). Interactions of peptide growth factors and oncogenes. In: Oncogenes, Genes and Growth Factors, Gufoff G. Ed., New York, John Wiley and Sons Inc.: 331-373.

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

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

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

Baserga, R. (1985). The biology of cell reproduction. Harvard University Press, Cambridge.

Beelman, C.A. & Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in Eukaryotes. Cell, 81: 179-183.

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

Benvenisnty, N., Leder, A., Kuo, A. & Leder, P. (1992). Na embrionically expressed gene is target for c-Myc regulation via the c-Myc-binding sequence. Genes Dev., 6: 2513-2524.

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

Bishop, J.M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. Ann Rev. Biochem., 52: 301-354.

Bishop, J.M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses. Ann. Rev. Biochem., 52: 301-354.

Bishop, J.M. (1985). Viral oncogenes. Cell, 42: 23-38.

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

Blackwood, E.M., Lüscher, B., Eisenman, R.N. (1992). Myc and Max associate *in vivo*. Genes Dev., 6: 71-80.

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

Burgering, B.M.T. & Bos, J.L. (1995). Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. Trends Biochem. Sci., 20: 18-22.

Chen, C. & Shyu, A. (1994). Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. Mol. Cell. Biol., 14: 8471-8482.

Chen, C. & Shyu, A. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. Trends in Biochem. Sci., 20: 465-470.

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

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

Consenza, S.C., Yumet, G., Soprano, D.R. & Soprano, K.J. (1994). Induction of c-fos and c-jun mRNA at the M/G1 border is required for cell cycle progression. J Cell. Biochem., 55: 503-512.

Curran T & Franza R. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. Cell, 55: 395-397.

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

Decker, C.J. & Parker, R. (1994). Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. Trends Biochem. Sci., 19: 336-340.

De Cesare, D., Vallone, D., Caracciolo, A., Sassone-Corsi, P., Nerlov, C. & Verde, P. (1995). Heterodimerization of c-Jun with ATF-2 and c-Fos is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. Oncogene, 11, 365-376.

Delegeane, A.M, Ferland, L.H. & Mellon, P.L. (1987). Tissue-specific enhancer of human glycoprotein hormone alpha subunit gene: dependece on cyclic AMP- inducible elements. Mol. Cell. Biol., 7: 3994-4002.

Desbarats, L., Gaubatz, S. & Eilers, M. (1996). Discrimination between different E-box binding proteins at the endogenous target os Myc. Genes Dev., 10: 447-460.

Dorsey, M.J., Tae, H,J., Sollenberger, K.G., Mascarenhas, N.T., Johansen, L,M. & Taparowsky, E.J. (1995). B-ATF: a novel bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. Oncogene, 11: 2255-2265.

Drapkin, R. & Reinberg, D.. (1994). The multifunctional TFIIH complex and transcriptional control. Trends Biochem. Sci., 19: 504-508.

Edwards, D.R. & Mahadevan, L.C. (1992). Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. EMBO J., 11: 2415-2424.

Eick, D., Kohlhuber, F., Wolf, D.A. & Strobl, L.J. (1994). Activation of pausing RNA polymerases by nuclear run-on experiments. Anal. Biochem., 218: 347-351.

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

Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. & Bishop, J.M. (1989). Chimaeras between the MYC oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependet transformation of cells. Nature, 340: 66-68.

Feig, L.A. (1993). The many roads that lead to Ras. Science, 260: 767-768.

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

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

Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R. & Eilers, M. (1995). Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. EMBO J., 14: 1508-1529.

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

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

Hai, T. & Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3720-3724.

Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vali, W., Tsien, R. & Montminy, M.R. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. Mol. Cell. Biol., 13: 4852-4859.

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

Holt, J.T., Gopal, T.V., Moultin, A.D. & Nienhuis, A.W. (1986). Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3685-3689.

Hunter, T. & Cooper, J.A. (1985). Protein-tyrosin kinases. Ann. Rev. Biochem., 54: 897-930.

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

Kataoka, K., Igarashi, K., Itoh, K., Fujiwara, K.T., Noda, M., Yamamoto, M. & Nishizawa, M. (1995). Small Maf proteins heterodimerizes with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. Mol. Cell. Biol., 15: 2180-2190.

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

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

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

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

Kimura, E., Frigeri, C.K. & Armelin, H.A. (1993b). Kinectis of inhibition in c-myc proto-oncogene expression and DNA synthesis caused by ACTH, dybutiryl cAMP and phorbol ester in mouse adrenocortical cells. Biochem., 12:103-108.

Kimura, E., Frigeri, C.K. & Armelin, H.A. (1993c). Relevance of c-fos proto-oncogene induction for the steroidogenic response to ACTH, dcAMP and phorbol ester in adrenocortical cells. Mol. Cell. Biochem., 124:23-32.

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

Kovary, K. & Bravo, R. (1991). The JUN and Fos proteins are both required for cell cycle progression in fibroblasts. Mol. Cell. Biol., 11: 4466-4472.

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

Lamph, W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. & Verma, I.M. (1998). Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. Nature, 334: 629-631.

Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. & Tijian, R. (1987). Activation of transcription of two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallotionein gene and SV40. Nature, 325: 386-372.

Martin, G.S. (1970). Rous Sarcoma Virus: a function required for maintenance of the transformed state. Nature, 227: 1021-1023.

Masquilier, D. & Sassone-Corsi, P. (1992). Transcriptional cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by Jun. J. Biol. Chem., 267, 22460-22466.

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

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

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

Nishikura, K. & Murray, J.M. (1987). Antisense RNA on proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. Mol. Cell. Biol., 40: 517-525.

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

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

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

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

Philipp, A., Schneider, A., Väsrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K. & Eilers, M. (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. Mol. Cell. Biol., 14: 4032-4043.

Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. & Scher, C.D. (1977). Induction of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells by serum components: reevaluation of the commitment process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 4481-4485.

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

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

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

Reisman, D., Elkind, N.B., Roy, B., Beamon, J. & Rotter, V. (1993). C-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. Cell Growth Differ., 4: 57-65.

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

Ryseck, R.P. & Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B and JUN D differ their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. Oncogene, 6: 533-542.

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

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

Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., Lamph, W.W. & Verma, I.M. (1988). Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. Nature, 336: 692-695.

Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J. & Verma, I.M. (1990). Cross-talk in signal transduction: TPA-inducible factor Jun/AP-1 activates cAMP responsive enhancer elements. Oncogene, 5: 427-31

Sassone-Corsi, P., Visvader, J., Ferland, L., Mellon, P.L. & Verma, I.M. (1988). Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP responsive element. Gene Dev., 2: 1529-1538.

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

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

Schiavi, S.C., Belasco, J.G. & Greenberg, M.E. (1992). Regulation of proto-oncogene mRNA stability. Bioch. Bioph. Acta, 1114: 95-106.

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

Shyu, A.B., Belasco, J.G. & Greenberg, M.E. (1991). Two distinct destabilizing elements in c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. Genes Dev., 5: 221-234.

Simpson, E.R. & Waterman, M.R. (1988). Regulation of the synthesis of steroidogenic enzimes in adrenal cortical cells by ACTH. Ann. Rev. Physiol., 50: 427-440.

Solomon, M.J. (1994). The function(s) of CAK, the $p34^{cdc2}$- activating kinase. Trends Biochem. Sci., 19: 496-500.

Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J. & Pledger, W.J. (1979). Dual control of cell growth by somatomedins and plateled derived growth factor. Proc. Natl. Acd. Sci USA, 76: 1279-83.

Struhl, K. (1996). Chromatin Structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription. Cell, 84: 179-182.

Sun, H. & Tonks, N.K. (1994). The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. Trends Biochem. Sci., 19: 480-485.

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

Wagner, A.J., Meyers, C., Laimins, L.A. & Hay, N. (1993). C-myc induces the expression and activity of the ornithine descarboxylase. Cell Growth Differ., 4: 879-883.

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

Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs, W.H. & Montminy, M.R. (1988). Phosphorylation induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. Nature,334: 494-498.

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

Young, R.A. & Koleske, A.J. (1995). The RNA polymerase II holoenzime and its implications for gene regulation. Trends Biochem. Sci., 20:113-116.

Dados Pessoais

Nome: Ana Paula Lepique

Nascimento: São Paulo, 12 de Agosto de 1971.

Educação

2° grau

Colégio Rio Branco, São Paulo

1985 a 1988.

3° grau

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

1989 a 1992

Bacharelado em Ciências Biológicas.

Universidade de São Paulo

Pós-graduação

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

1993 a 1996

Mestre em Bioquímica.

Ocupação

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Doutoramento em Bioquímica

Bolsa: FAPESP

Publicação

Armelin, H. A., Lotfi, C. F. P., Lepique, A. P. Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of adrenocortical cell. Endocrine Res. 1996. In press.