

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

Av. 19. 501

Sheila

NAO LIC



INSTITUTO DE QUÍMICA

USP

*Mecanismos moleculares da
transformação maligna mediada pelo
antígeno MT do vírus polioma.*

Dissertação de Mestrado

Sheila Maria Brochado

Mari Cleide Sogayar

Orientadora

São Paulo

22 de Fevereiro de 2001

DEDALUS - Acervo - CQ



30100003568

Ficha Catalográfica

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

Brochado, Sheila Maria
B863m Mecanismos moleculares da transformação maligna mediada
pelo antígeno MT do vírus polioma / Sheila Maria Brochado.
-- São Paulo, 2001.
109p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Sogayar, Mari Cleide

1. Biologia molecular 2. Bioquímica 3. Biologia celular
I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD

**"Mecanismos Moleculares da
Transformação Maligna Mediada pelo
Antígeno MT do Vírus Polioma".**

SHEILA MARIA BROCHADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS - ÁREA: BIOQUÍMICA.

Aprovada por:

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
IQ - USP

Profa. Dra. EUGENIA COSTANZI
ICB - USP

22 DE FEVEREIRO DE 2001.

***“Não creia no que os seus olhos lhe dizem.
Tudo que mostram é limitação.
Olhe com o entendimento,
descubra o que você já sabe,
e verá como voar...”***

Richard Bach
(A História de Fernão Capelo Gaivota)

Aos meus pais, por seu amor,
por estarem sempre ao meu lado
me incentivando em cada momento.

À minha irmã, por ser a minha amiga mais especial.

***"Não há nada que esteja só;
nada pode estar em completa solidão:
o que existe necessita de outro para ser."***

Leopoldo Schfer

Ao Herbert, por sua dedicação, seu amor,
por estar ao meu lado,
me incentivando em todos os momentos,
por me fazer cada dia mais feliz...

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram e me incentivaram para a conclusão deste trabalho.

À Dra. Mari Cleide Sogayar, por ter acreditado e investido em mim, por todas as oportunidades, pela compreensão e amizade.

À Maria Leonor, que me ensinou desde os primeiros passos neste laboratório, por sua dedicação e amizade.

À Regina Maki, por me ensinar e me incentivar em cada experimento, por acreditar em mim, pela amizade, enfim... por ser esta pessoa especial com a qual eu pude conviver e aprender tanto durante este anos.

À vocês duas, Léo e Maki, por terem sido minhas verdadeiras “Co-orientadoras”.

Ao Prof. José Mauro Granjeiro por acreditar e viver a ciência de uma maneira realmente iluminada. Com você aprendi que ser “insano” de vez em quando, deixa a vida muito mais divertida...

À Fernanda e Lúcia pela amizade, boas rizadas e dicas de bancada.

Aos amigos do laboratório Ana Paula, Antero, Aurea, Beth, Carlos, Christian, Cleber, Débora, Denise, Diana, Fernanda, Fernando, Irenice, Karin, Leonardo, Lúcia, Maki, Marcos, Mário, Renata, Ricardo, Roberto, Sandra Regina, Sandra Valéria, Silvy, Tatiana, Theri, Wagner e Zizi pela amizade e ajuda em todos os momentos.

À Zizi, Sandra, Débora, Irenice e Adriana pelo excelente apoio técnico.

Aos Profs. Pio Colepicolo, Carla Columbano e Paulo Lee Ho pelas críticas e sugestões na minha qualificação.

À Maki, Fernanda, Léo, Herbert e Fábio pelas sugestões e correções deste trabalho.

Ao Prof. João César Baptista por seu jeito especial de ser e por me inspirar a traçar este caminho.

Ao Prof. Omar El Seoud que abriu as portas do seu laboratório ainda nos tempos de iniciação científica.

Aos amigos de graduação Fábio, Glaucia, Marcela, César, Ricardo e Rodrigo pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Às amigas sempre presentes Erika, Fernanda e Priscila, pela amizade que ainda dura.

Ao Prof. Hugo Armelin e todo seu grupo pelas discussões e sugestões nos seminários de sexta-feira.

Ao Prof. Luiz Henrique Catalani e ao pós-graduando Valdecir pela disponibilidade e ajuda no uso do aparelho luminômetro.

Ao Prof. Roberto Santelli pela amizade, apoio em todos os momentos e pelo uso do aparelho Storm.

Ao Prof. Pio Colepicolo e aos pós-graduandos Oswaldo Keith e Maria Antonieta pelos materiais cedidos e ajuda nos experimentos de glutaciona.

Ao Instituto de Química-USP pelo apoio institucional, e a todos os seus funcionários pelos serviços prestados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

À toda minha família por me ensinarem a verdadeira "ciência de viver".

E, finalmente, gostaria de agradecer a Deus por poder estar aqui, realizar este trabalho, enfim... pela minha vida.

Apoio Financeiro

FAPESP:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
ICGEB:	International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.
PADCT-SBIOII:	Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Subprograma de Biotecnologia
CABBIO:	Centro Argentino-Brasileiro de Biotecnologia.
PRP-USP:	Pró-Reitoria de Pesquisa da USP.

Índice

Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	ii
Resumo	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
1) Introdução	5
1.1) Controle da proliferação celular	5
1.1.1) Oncogenes e genes supressores de tumor	8
1.2) Proteínas quinases e fosfatases	10
1.3) Mecanismo de ação de fatores peptídicos de crescimento	11
1.3.1) Receptor de PDGF	14
1.3.2) Interação do receptor de PDGF com moléculas sinalizadoras	18
1.3.3) Interação do receptor de PDGF com proteínas tirosinas fosfatases	25
1.4) Complexo de transcrição AP-1	28
1.5) Vírus polioma – modelo de transformação celular	33
1.5.1) O antígeno LT	36
1.5.2) O antígeno ST	37
1.5.3) O antígeno MT	37
1.5.3.1) Associação de MT à proteínas celulares	38
1.5.3.2) A oncoproteína MT mimetiza PDGF	43
1.5.3.3) Ativação do complexo de transcrição AP-1 por MT	46
2) Proposta	48
3) Materiais e Métodos	49
3.1) Plasmídeos	49
3.2) Linhagens celulares	50
3.3) Materiais utilizados para cultura de células de mamíferos	50
3.4) Meio de cultura para bactéria	51
3.5) Soluções	51
3.6) Preparo de bactérias competentes utilizando CaCl ₂	51
3.7) Preparação de DNA plasmideal em média escala	52
3.8) Cultura de células	53
3.9) Transfecção de células de mamíferos com DNA plasmideal	53
3.10) Isolamento dos clones celulares	54

3.11)	Transfecção transitória e ensaios de gene repórter	54
3.12)	Preparação de mRNAs	55
3.13)	Ensaio de Northern-blot	57
3.14)	Curvas de crescimento	58
3.15)	Crescimento em suspensão de agarose	59
3.16)	Extração da proteína citoplasmática-LMWPTP	59
3.17)	Determinação da atividade enzimática da LMW-PTP	60
3.18)	Determinação de glutatona reduzida e glutatona total	60
3.19)	Análise estatísticas dos dados	61
4)	Resultados	62
4.1)	Análise do efeito morfológico do mutante dominante-negativo de cJun em células transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma	65
4.2)	Análise da expressão do mutante dominante-negativo de cJun	68
4.3)	Análise do potencial de proliferação dos clones celulares obtidos	72
4.4)	Análise do envolvimento da LMW-PTP na transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma	78
4.5)	Análise da expressão da LMW-PTP na linhagem celular que expressam a proteína MT do vírus polioma	80
4.6)	Análise do nível de estresse oxidativo na linhagem que expressa o antígeno MT do vírus polioma	81
5)	Considerações Finais	84
5.1)	Papel do complexo de transcrição AP-1 na transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma	85
5.1.1)	Mecanismo de ativação de AP-1 mediado por MT	87
5.2)	Papel da LMW-PTP na transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma	92
6)	Conclusões	94
7)	Referências Bibliográficas	95
8)	Curriculum Vitae	108

Índice de Figuras

Figura 1	Ciclo celular	6
Figura 2	Representação esquemática do receptor- β de PDGF	17
Figura 3	Mecanismo de ativação da proteína quinase Src	21
Figura 4	Esquema da ativação de Ras	23
Figura 5	Representação esquemática das vias de MAPKs	25
Figura 6	Estrutura de um gene típico	29
Figura 7	Transrepressão mútua de Fos/Jun e receptor de glicocorticóide	33
Figura 8	Mapa representativo do genoma do vírus polioma	35
Figura 9	Representação esquemática da proteína MT do vírus polioma.	38
Figura 10	Associação do antígeno MT à Src	40
Figura 11	Comparação entre o sinal mitogênico desencadeado por PDGF e pelo antígeno MT do vírus polioma	45
Figura 12	Estrutura e modo de ação do mutante dominante negativo de cJun	63
Figura 13	Representação do vetor pCMV-67	64
Figura 14	Morfologia dos clones MTJ	66
Figura 15	Morfologia dos clones MTC	67
Figura 16	Expressão do mutante dominante negativo de cJun	69
Figura 17	Atividade do complexo AP-1 nos diferentes clones celulares	71
Figura 18	Perfil do crescimento das linhagens celulares na presença de diferentes concentrações de soro	73
Figura 19	Crescimento em suspensão de agarose – clones MTC	76
Figura 20	Crescimento em suspensão de agarose – clones MTJ.	77
Figura 21	Atividade específica da LMW-PTP em células que expressam o antígeno MT do vírus polioma	79
Figura 22	Expressão da LMW-PTP em células que expressam o antígeno MT do vírus polioma	81
Figura 23	Análise do conteúdo de glutathiona reduzida/oxidada em células transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma	83
Figura 24	Regulação da fosforilação das proteínas da família Jun. Esquema das possíveis vias utilizadas por MT	91

Índice de Tabelas

Tabela 1	Características gerais de células normais e transformadas cultivadas <i>in vitro</i>	8
Tabela 2	Exemplos de receptores com atividade de tirosina quinase	12
Tabela 3	Comparação dos tempos de dobramento e densidades de saturação dos diferentes clones analisados	74

Resumo

O vírus polioma causa múltiplos tumores em camundongos. Seu genoma codifica três proteínas associadas com a transformação celular: "Large T" (LT), "Middle T" (MT) e "Small T" (ST). A oncoproteína MT desempenha um papel central na transformação celular por se associar e ativar diversas proteínas citoplasmáticas que participam no processo de transdução do sinal mitogênico de fatores de crescimento, do qual fazem parte proteínas quinases e fosfatases. Nosso grupo mostrou que o fator de transcrição AP-1 é ativado constitutivamente pelo antígeno MT durante a transformação celular, entretanto esta ativação não é suficiente para mediar este processo. Os objetivos do presente trabalho foram investigar a necessidade da ativação constitutiva de AP-1 e o papel da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP) na transformação maligna induzida por MT. A super-expressão de um mutante dominante negativo de cJun em células transformadas por MT causou alterações morfológicas (achatamento celular) e inibição do crescimento celular em meio semi-sólido. Análises da LMW-PTP em células que expressam a proteína MT mostrou a ocorrência de uma inibição da atividade específica desta enzima, porém a sua expressão no nível transcricional mostrou-se inalterada. Os resultados sugerem a necessidade de ativação do complexo AP-1 na transformação maligna mediada por MT e o envolvimento da LMW-PTP neste processo de transformação maligna.

Abstract

Polyomavirus is a DNA tumor virus that induces a variety of tumors in mice. Its genome encodes three proteins, namely, Large T, Middle T and Small T antigens, which have been implicated in cell transformation. The MT oncoprotein plays an essential role in cell transformation by binding to and activating several cytoplasmic proteins that participate in growth factors-induced mitogenic signal transduction to the nucleus. We have previously reported that the AP-1 transcriptional complex is a target for MT during cell transformation, but AP-1 activation does not seem to be sufficient for cell transformation. Here, we have analyzed the requirement for AP-1 activation and the role of the low molecular weight acid phosphatase protein (LMW-PTP) in MT-induced cell transformation. Overexpression of a dominant-negative cJun mutant in MT transformed cells, led to morphological alterations (cell flattening) and inhibition of cell growth in agarose suspension. Analysis of the low molecular weight acid phosphatase protein in MT transformed cells showed a decrease in the specific activity of this enzyme, but gene expression was not altered at the transcriptional level. The results obtained suggest that the AP-1 complex is necessary for cell transformation induced by MT and indicate the involvement of the low molecular weight acid phosphatase protein in this process.

Abreviaturas

AP-1:	Proteína ativadora 1.
Cdks:	Proteínas quinases dependentes de ciclinas.
CMV:	Citomegalovírus.
CRE:	Elemento responsivo à cAMP.
CREB:	Ligação à CRE.
CSF:	Fator estimulador de colônias.
Cys:	Cisteína.
DAG:	Diacilglicerol.
DMEM:	“Dulbecco’s Modified Eagle’s medium”.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
EDTA:	Ácido etileno dinitrilo tetracético.
EGTA:	Ácido etileno bisoxietilenonitrilo tetracético.
EGF:	Fator de crescimento epidérmico.
Elk:	Proteína quinase de homologia a <i>ets</i> .
EMSA:	Ensaio de mobilidade eletroforética.
Erks:	Proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares.
FCS:	Soro Fetal Bovino.
FGF:	Fator de crescimento de fibroblastos.
GAP:	Proteína ativadora de GTPases.
GDP:	Difosfato de guanina.
GR:	Receptor de glicocorticóide.
GRE:	Elemento responsivo à glicocorticóide.
Grb2:	Proteína ligante 2 de receptor de fator de crescimento.
GSH:	Glutationa na forma reduzida.
GSK3:	Glicogênio sintase quinase 3.
GSSG:	Glutationa na forma oxidada.
GTP:	Trifosfato de guanina.
HGF:	Fator de crescimento de hepatócitos.
HSV:	Vírus Herpes Simplex.
IGF:	Fator de crescimento semelhante a insulina.
IgG:	Imunoglobulina G.
IP₃:	Inositol trifosfato.
JNK:	Proteína quinase N-terminal de Jun.
kDa:	Kilodaltons.
LT:	Antígeno “Large T”.
LMW-PTP:	Proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular.
MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógeno.
MAPKK:	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno.
MAPKKK:	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno.
MEK:	Quinase das MAPKs e Erks.
MOPS:	Ácido 3-[N-Morfolino] propano sulfônico.
MT:	Antígeno “Middle T”.
NPTY:	Asparagina-Prolina-Treonina-Tirosina.
OD:	Densidade óptica.
PDGF:	Fator de crescimento derivado de plaquetas.
PDGF-R:	Receptor de PDGF.
Phe:	Fenilalanina.
PI3K:	Proteína quinase de fosfatidilinositol.
PI3P:	Fosfatidilinositol-3-fosfato.
PI3,4P₂:	Fosfatidilinositol-3,4-difosfato.
PI3,4,5P₃:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.

PKC:	Proteína quinase C.
PLCγ:	Fosfolipase C γ .
PP2A:	Fosfatase 2A.
pp70^{96k}:	Quinase da proteína S6 de ribossomo.
Pro:	Prolina
PTB:	Domínio de ligação à fosfotirosinas.
PTK:	Proteína tirosina quinase.
PTP:	Proteína tirosina fosfatase.
ptyr:	Resíduo de fosfotirosina.
RB:	Gene de susceptibilidade ao retinoblastoma.
SEAP:	Fosfatase alcalina secretada.
SDS:	Dodecil sulfato de sódio.
Ser:	Serina.
SH:	Homologia à proteína Src.
SHP:	Proteína tirosina fosfatase contendo domínio SH.
Shc:	Homologia à Src e colágeno.
Sos:	Homólogo da proteína Son of sevenless de <i>Drosophila</i> .
SRE:	Elemento responsivo à soro.
SSC:	Solução salina contendo citrato de sódio, pH 7,0.
ST:	Antígeno "Small T".
STATs:	Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição.
Thr:	Treonina.
TK:	Timidina quinase.
TNF-α:	Fator tumoral de necrose- α .
TPA:	13-acetato de 12- <i>o</i> -tetradecanoil forbol.
TRE:	Elemento responsivo à TPA.
Tyr:	Tirosina.

1) Introdução

1.1) Controle da proliferação celular.

O desenvolvimento de um organismo depende do balanço entre proliferação, diferenciação e morte celular. Alterações que causam o descontrole deste equilíbrio podem levar ao desenvolvimento de tumores.

A regulação da divisão celular é um passo crítico para o controle do desenvolvimento normal de organismos multicelulares, sendo controlada, basicamente, em dois pontos do ciclo celular: o início da síntese de DNA e o início da mitose.

Durante o ciclo celular podem ser distinguidas as seguintes fases (Fig. 1):

- a) **G1** ("Gap 1") - Intervalo após a mitose durante o qual as células se preparam para iniciar a síntese de DNA. Este período é caracterizado pela transcrição e tradução de vários genes, levando à síntese de proteínas necessárias para a síntese de DNA.
- b) **S** - Período no qual ocorre a duplicação do DNA celular.
- c) **G2** ("Gap 2") - Intervalo após a síntese de DNA, durante o qual as células se preparam para a divisão.
- d) **M** - Período mitótico, durante o qual duas novas células são geradas, com o mesmo conteúdo de DNA da célula-mãe.

O controle do ciclo celular é baseado em duas famílias de proteínas: as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (Cdks). Cdks promovem a progressão através das diferentes fases do ciclo celular, por promoverem a fosforilação de substratos. Sua atividade quinásica é dependente da presença de subunidades ativadoras conhecidas como ciclinas. A abundância de ciclinas específicas é controlada durante as fases do ciclo celular de acordo com o seu requerimento. Cada subunidade catalítica Cdk pode se associar a diferentes ciclinas, sendo que a ciclina associada determinará quais proteínas serão fosforiladas pelo complexo ciclina-Cdk formado.

Os complexos específicos ciclinas/Cdks ativados são responsáveis pela fosforilação de proteínas específicas necessárias para a progressão pelo ciclo

celular. Como exemplo desta regulação pode ser citado a transição da fase G1→S do ciclo celular, onde os complexos ciclinaD1/Cdk4 e posteriormente ciclinaE/Cdk2 promovem a fosforilação e inativação do gene supressor de tumor Rb (gene de susceptibilidade ao retinoblastoma), proporcionando a liberação de membros da família E2F de fatores de transcrição. E2F livre promoverá, por sua vez, a transcrição dos genes que iniciam a transição para a fase S do ciclo celular (revisto por King & Cidlowski, 1998, Jones & Kazlauskas, 2000).

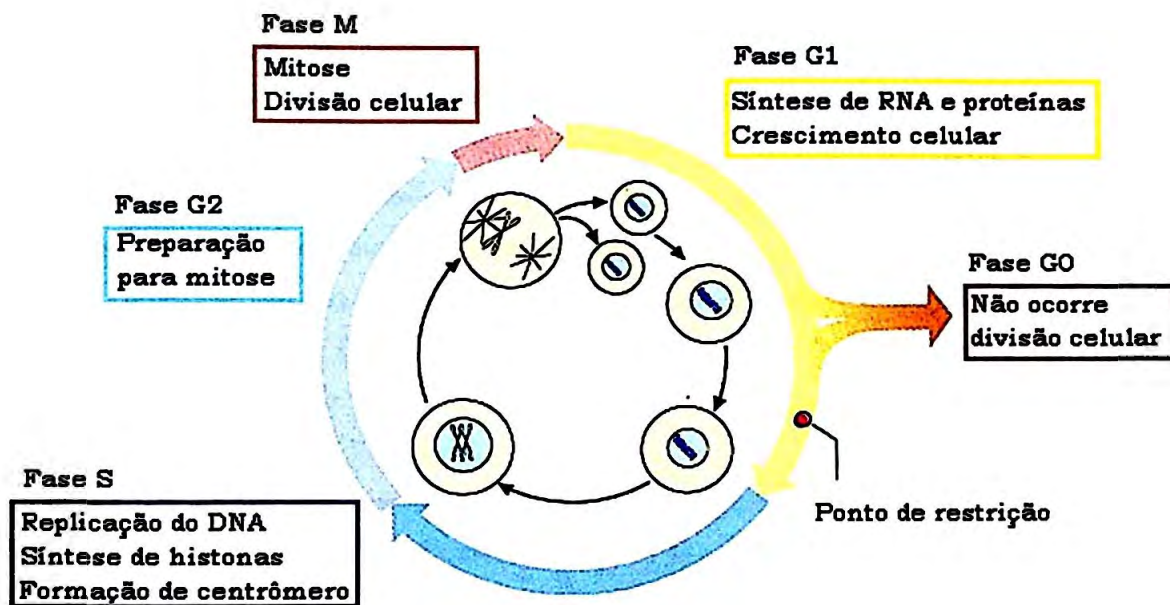


Fig. 1: Ciclo celular. Representação das fases do ciclo celular (adaptado de Koolman & Röhm, 1996).

Após a mitose, as células podem continuar no estado proliferativo, entrando novamente na fase G1, ou passar para um estado de quiescência, de duração indefinida, denominado G0. A saída de G0 e entrada em G1 irá depender dos estímulos que a célula recebe do meio. No caso de células normais, baixas concentrações de fatores mitogênicos no meio de cultura ou mesmo alta densidade celular, são condições que levam a célula a permanecer em G0.

O estabelecimento de células 3T3 em cultura, em condições próximas às fisiológicas, (Todaro & Green, 1963) permitiu a análise dos fatores requeridos

para o crescimento de linhagens celulares estabelecidas a partir de células normais (ou tumorais), viabilizando ensaios reprodutíveis, sob condições controláveis.

A observação de que a proliferação celular *in vitro* pode ser controlada por meio da concentração de soro presente no meio de cultura, o qual funciona como fonte de fatores peptídicos de crescimento e hormônios, (Armelin, 1973) levou ao estabelecimento de ensaios que contribuem até hoje para o estudo do controle do ciclo celular (Armelin *et al.*, 1985).

Fatores peptídicos de crescimento e hormônios exercem o controle do ciclo celular em mamíferos (Armelin, 1990). Historicamente, fatores peptídicos de crescimento foram descritos como controladores positivos da proliferação celular. Entretanto, sua ação depende da integração de diferentes sinais que a célula recebe através de receptores específicos (Cross & Dexter, 1991). Desta forma, um mesmo fator pode promover ou inibir eventos como proliferação ou diferenciação celular, dependendo do tipo celular e das condições fisiológicas. Um exemplo clássico é a ação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (revisto por Armelin, 1990) que age como estimulador da proliferação em células Balb-3T3 e diferenciação de células PC12 em neurônios.

A interação entre os vários fatores de crescimento ficou clara através dos estudos de Pledger e colaboradores (1977) que mostraram que linhagens celulares Balb-3T3 quiescentes, somente eram induzidas a sintetizar DNA quando PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) presente no soro era adicionado juntamente com plasma à cultura (Pledger *et al.*, 1977, revisto por Armelin, 1990). A partir desses resultados, dois conceitos importantes foram estabelecidos:

- a) **Competência:** como sendo o estado que permite à célula quiescente entrar em um novo ciclo celular, chegando ao início de G1. Este estado é desencadeado por fatores como PDGF e FGF - os chamados fatores de competência.
- b) **Progressão:** que é desencadeada, em células competentes, por fatores presentes no plasma como EGF (fator de crescimento epidérmico), insulina e IGF (fator de crescimento semelhante a insulina) - os chamados fatores de progressão, permitindo a célula atingir a fase S

(durante a qual ocorre a síntese de DNA). Uma vez atingida a fase S, as etapas seguintes do ciclo celular tornam-se relativamente independentes da concentração de fatores peptídicos no meio de cultura (Pardee, 1989).

Com base na necessidade da combinação de fatores de competência e progressão para a síntese de DNA e utilizando experimentos de manipulação dos componentes do meio de cultura, alguns pontos específicos foram definidos durante a fase G1: os pontos C, V e R (Pardee, 1974). O ponto C é alcançado quando as células competentes estão aptas a responder aos fatores de progressão. Este ponto pode ser alcançado por células quiescentes estimuladas com PDGF. Após a passagem pelo ponto C, fibroblastos murinos podem ser induzidos a entrar em S pela adição de plasma (meio pobre em PDGF). Entretanto, para percorrer G1 após o ponto C, é necessária a presença de EGF e insulina no meio. O ponto V foi localizado a 6 horas da fase S, quando a presença de aminoácidos essenciais no meio é fundamental. O ponto R, caracterizado como um comprometimento da célula com a divisão celular, localiza-se a 2 horas do início de S, sendo dependente de síntese protéica.

1.1.1) Oncogenes e genes supressores de tumor.

Diversas características diferenciam células tumorais das células normais. As primeiras são capazes de proliferar sob condições adversas, onde as células normais deixam de proliferar e entram num estado de repouso. A comparação de algumas características de células normais e tumorais é apresentada na Tabela 1:

Tabela 1. Características gerais de células normais e transformadas cultivadas *in vitro* (adaptado de Cooper, 1995)

<i>Características</i>	<i>Células Normais</i>	<i>Células Tumorais</i>
adesão ao substrato	alta	baixa
morfologia	achatada	arredondada
dependência de ancoragem para o crescimento	presente	ausente
inibição do crescimento pela densidade	presente	ausente
requerimento de fatores de crescimento	alto	baixo

Dados baseadas no crescimento de fibroblastos normais e de células epiteliais em cultura.

A capacidade de desenvolver tumores em animais de forma eficiente (alguns vírus são capazes de induzir a formação de tumores alguns dias após a infecção) e reprodutível, tornou os vírus tumorais importantes modelos para o estudo da transformação celular. O genoma relativamente pequeno destes vírus estimulou estudos moleculares que levaram à identificação dos produtos gênicos responsáveis pela indução da transformação celular, denominados oncogenes.

O primeiro vírus descrito associado à indução de tumores em animais foi o retrovírus RSV (vírus do Sarcoma de Rous) (Rous, 1911). A análise do seu material genético permitiu a identificação do primeiro oncogene, denominado *v-src* (Martin, 1970).

O isolamento de uma sequência de DNA celular homóloga a *v-src* (denominada *c-src*) estabeleceu a teoria de que oncogenes virais estão originalmente presentes no genoma de células não infectadas, sendo integrados no genoma viral por processos de recombinação, durante a infecção. Estes homólogos celulares são conhecidos como proto-oncogenes e exercem funções específicas no controle da proliferação de células normais, podendo tornar-se oncogênicos (então denominados oncogenes) quando ativados por mecanismos que levam ao descontrole de sua função, por exemplo: mutações, expressão alterada e interação de seus produtos com proteínas virais. Uma grande quantidade de novos oncogenes foi descrita ao longo dos últimos anos, sendo o conhecimento de suas funções, fundamental para o entendimento do controle normal da proliferação celular.

Uma outra classe de genes controladores do ciclo celular são os genes supressores de tumor. Estes foram descobertos através de evidências de que o fenótipo neoplásico pode ser resultado da perda de função de um gene. Experimentos de fusão de células normais com células de origem tumoral levavam a híbridos com fenótipo normal (Harris *et al.*, 1969). Entre os exemplos de genes supressores de tumor mais estudados estão o gene RB (gene de susceptibilidade ao retinoblastoma) e o gene p53 (revisto por King & Cidlowski, 1998). Deleções em regiões cromossômicas e mutações que levam à perda da função de um gene, assim como associação de seus produtos protéicos à

proteínas virais (com conseqüente perda de função) são eventos que podem levar à transformação celular pela inativação de genes supressores de tumor.

Os produtos destas duas classes de genes, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor, atuam de forma coordenada no controle da proliferação de células normais, e cooperam na evolução de um processo neoplásico. Assim, um único evento não é suficiente para a tumorigênese, sendo necessária a ocorrência de uma combinação de eventos que afetam a função de genes pertencentes a estas duas classes (revisto por Hunter, 1991). Esse fato é observado também no estudo *in vitro*, pois a indução do fenótipo transformado é dependente da ação de determinadas combinações de oncogenes, como os antígenos MT ("middle T") e LT ("large T") do vírus polioma (Rassoulzadegan, 1983) ou proto-oncogenes celulares como *myc* e *ras* (Land *et al.*, 1983). A partir destas observações, os oncogenes podem ser divididos em duas classes complementares: **a)** genes com capacidade de imortalizar culturas primárias (como LT do vírus polioma e *c-myc*) e **b)** genes com propriedades transformantes (MT do vírus polioma e *ras*).

Com o desenvolvimento de modelos experimentais que possam mimetizar as condições observadas *in vivo* e do estudo dos processos que ocorrem durante a transformação celular, muitas contribuições têm sido feitas para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo controle do crescimento celular normal.

1.2) Proteínas quinases e fosfatases

As células são capazes de reagir a mudanças no meio externo por meio da transdução do sinal extracelular, produzindo respostas intracelulares.

A fosforilação de proteínas desempenha um papel crucial na proliferação celular em eucariotos, assim como em vários outros processos celulares, transduzindo o sinal mitogênico até o núcleo. A transdução do sinal mitogênico por fosforilação é um processo reversível que requer não apenas proteínas quinases como também proteínas fosfatases. Tanto a fosforilação, catalisada por proteínas quinases, como a retirada do fosfato, catalisada por proteínas fosfatases, são processos altamente específicos (Hunter, 1998).

O uso de cascatas de fosforilação para a transdução de sinal permite eventos como amplificação do sinal, controle negativo e "cross-talk" entre as

diversas vias de sinalização. Em geral, ao contrário de sistemas contendo uma única enzima, cascatas de enzimas são relacionadas a sistemas mais desenvolvidos por serem capazes de responder a um número maior de reguladores e poderem alcançar um alto grau de amplificação.

O requerimento de uma ação coordenada de proteínas tirosinas quinases (PTKs) e proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) na transdução do sinal mitogênico tem sido amplamente estudado ao longo dos anos (revisto por Sun & Tonks, 1994, Hunter, 1998). PTPs são, em geral, responsáveis pela atenuação do sinal mitogênico desencadeado pela atividade de PTKs. Fibroblastos quiescentes apresentam poucas proteínas com resíduos de tirosina fosforilados. A estimulação por PDGF leva a um aumento transitório da fosforilação em tirosina em diversas proteínas celulares, entre as quais o próprio receptor (Heldin & Westermark, 1999). A duração da fosforilação pode ser aumentada por tratamento das células com um inibidor de fosfatases, como por exemplo o ortovanadato (Posner *et al.*, 1994).

Muitos produtos de oncogenes promovem uma atividade quinásica desregulada, caracterizada pela fosforilação inadequada de proteínas e consequente proliferação celular descontrolada e oncogênese. Altos níveis de proteínas fosforiladas em tirosina são encontrados em linhagens celulares transformadas por proteínas oncogênicas como v-Src do vírus de sarcoma de Rous ou o antígeno MT do vírus polioma (Eckhart *et al.*, 1979, Hunter & Sefton, 1980).

1.3) Mecanismo de ação de fatores peptídicos de crescimento.

Fatores peptídicos de crescimento e hormônios são componentes importantes que coordenam o desenvolvimento de organismos eucarióticos. Estes fatores se ligam e ativam receptores celulares, muitos dos quais possuem atividade de tirosina quinase intrínseca.

Em geral, receptores de fatores peptídicos de crescimento com atividade proteína quinase possuem um domínio de ligação ao ligante na porção extracelular da molécula, um domínio transmembrânico hidrofóbico e um

domínio tirosina quinase na porção citoplasmática (Williams, 1989, Heldin & Westermark, 1999).

O sinal de ativação do receptor, através da interação do ligante ao domínio de ligação extracelular, deve ser transduzido através da membrana plasmática a fim de ativar os domínios tirosina quinases citoplasmáticos da molécula.

Com base em características estruturais distintas dos domínios extracelulares dos receptores com atividade tirosina quinase é possível separá-los em subclasses. Os domínios estruturais extracelulares incluem sequências repetidas ricas em cisteína, estruturas tetraméricas unidas por pontes dissulfeto, sequências repetidas tipo imunoglobulinas, entre outros (Fantl *et al.*, 1993) (tabela 2).

Tabela 2: Exemplos de receptores com atividade de tirosina quinase.

<i>Família</i>	<i>Exemplos</i>	<i>Características dos domínios extracelulares</i>
PDGF-R	PDGF-R α , PDGF-R β , CSF-R	Cinco domínios similares à IgG
EGF-R	EGF-R (ErbB), ErbB2 (Neu), ErbB3, ErbB4	Dois domínios ricos em cisteínas
FGF-R	FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, FGF-R4	Dois a três domínios similares a IgG
IGF-R	insulina-R, IGF-1R	Pontes dissulfeto entre cadeias α e β
HGF-R	HGF-R (Met)	Sete domínios similares à IgG

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas, CSF: Fator estimulador de colônias, EGF: Fator de crescimento epidérmico, FGF: Fator de crescimento de fibroblastos, IGF: Fator de crescimento semelhante a insulina, HGF: Fator de crescimento de hepatócitos, IgG: imunoglobulina G.

A interação do ligante ao domínio extracelular do receptor promove uma mudança conformacional neste domínio, induzindo a dimerização destes receptores. A dimerização dos receptores é acompanhada por interações entre os domínios citoplasmáticos adjacentes, a fim de promover a estabilidade do complexo (Williams, 1989; Ulrich & Schlessinger, 1990; Heldin & Westermark, 1999).

A oligomerização é um evento universal entre os receptores de fatores peptídicos de crescimento. Este evento pode ser induzido por moléculas monoméricas, como o EGF, as quais induzem uma mudança conformacional no receptor resultando na interação receptor-receptor (Greenfield *et al.*, 1989) ou por

moléculas diméricas, como o PDGF, as quais medeiam a dimerização de receptores próximos na membrana plasmática (Heldin & Westermark, 1999).

A dimerização é seguida por auto-fosforilação dos receptores, que pode ocorrer por uma molécula fosforilando a outra levando, conseqüentemente, à ativação deste receptor. Em geral, a fosforilação ocorre em duas principais classes de resíduos de tirosinas:

a) resíduos internos do domínio de quinase: a fosforilação destes resíduos precede a fosforilação de outros sítios e induz um aumento da atividade de tirosina quinase, como no caso dos receptores de insulina (White *et al.*, 1988), do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Mohammadi *et al.*, 1996) e fator de crescimento derivado de plaquetas (Heldin & Westermark *et al.*, 1999).

b) resíduos fora do domínio de quinase - estas tirosinas fosforiladas funcionam como pontos de ancoramento para proteínas que contêm domínios SH2 (domínio homólogo a Src, tipo 2) as quais exercem o papel de transdutoras do sinal mitogênico para o núcleo (Heldin & Westermark, 1999).

Os domínios quinásicos, presentes na porção citoplasmática da molécula do receptor, são sequências altamente conservadas em todas as proteínas quinases, sendo constituídos de aproximadamente 300 aminoácidos (Hanks *et al.*, 1988; Ulrich & Schlessinger, 1990).

Os domínios SH2 são domínios conservados, constituídos de aproximadamente 100 aminoácidos, formando um tipo de “bolso” onde a tirosina fosforilada e os aminoácidos vizinhos se encaixam. A especificidade de ligação de cada domínio SH2 presente em proteínas diferentes é dada pela sequência de três resíduos localizados na porção C-terminal em relação à tirosina fosforilada, variando consideravelmente para diferentes SH2 (revisto por Cohen *et al.*, 1995). Moléculas transdutoras de sinal possuem diversos tipos diferentes de domínios os quais são capazes de mediar interações entre diferentes componentes das vias de sinalização celulares. Além dos domínios SH2, domínios PTB (domínio de ligação à fosfotirosinas) são também capazes de reconhecer resíduos de tirosina fosforilados. Pode-se citar o domínio PTB de Shc que parece estar envolvido na interação de Shc com a Tyr-250 fosforilada do antígeno MT do vírus polioma (Blaikie *et al.*, 1997).

A ativação dos receptores com atividade tirosina quinase, pela interação com fatores peptídicos de crescimento, resulta na ativação de outras proteínas quinases, gerando cascatas de sinalização que promovem a intercomunicação entre as diversas vias de transdução de sinal existentes, já que muitas moléculas sinalizadoras possuem múltiplos alvos celulares. A rápida internalização e degradação do complexo ligante-receptor constitui um importante parâmetro na regulação da resposta mitogênica.

1.3.1) Receptor de PDGF

PDGF é um fator peptídico composto pelas cadeias A e B com, respectivamente, 17 e 16 kDa, as quais podem se associar na forma de homo (AA ou BB) ou heterodímeros (AB) por meio de pontes dissulfeto. As cadeias A e B de PDGF são constituídas de ~100 resíduos de aminoácidos, tendo cerca de 60% de identidade entre elas. Oito resíduos de cisteínas são perfeitamente conservados entre as duas cadeias, sendo que 2 destes resíduos (Cys-2 e Cys-4) estão envolvidos nas ligações dissulfeto entre as subunidades do dímero de PDGF, enquanto que os outros 6 resíduos de cisteínas formam pontes dissulfeto intramoleculares (Cys-1:Cys-6, Cys-3:Cys-7 e Cys-5:Cys-8) (Heldin & Westermark, 1999).

A atividade de PDGF foi primeiro descrita no estudo da análise comparativa do potencial mitogênico do soro e do plasma sanguíneo (Balk, 1971). Após a coagulação do sangue, PDGF é liberado das plaquetas, tendo uma vida média extremamente curta (aproximadamente 2 minutos) o que limita a sua ação *in vivo* às células próximas ao local de liberação (mecanismo de ação tipo parácrino). A importância de PDGF está relacionada a processos de cicatrização, desenvolvimento, aterosclerose e neoplasia (Heldin & Westermark, 1999).

As isoformas de PDGF atuam nos diferentes tipos celulares por ativação de diferentes tipos de receptores do tipo tirosina quinase. Os receptores de PDGF do tipo α e β são moléculas de ~170 e 180 kDa, respectivamente, que se associam às cadeias A e B de PDGF.

Na porção extracelular, estes receptores contém 5 domínios de homologia a imunoglobulinas, caracterizados por grupos regularmente distribuídos de

resíduos de cisteínas, capazes de formar pontes dissulfeto entre si (Williams, 1989). A região transmembrânica é composta por um domínio de aproximadamente 20 aminoácidos hidrofóbicos que é importante para a transdução do sinal através da membrana citoplasmática (Escobedo *et al.*, 1988). A porção intracelular contém um domínio tirosina quinase (região C-terminal) característico de todas as moléculas quinases, separado em duas porções por um longo trecho de aminoácidos (Yarden *et al.*, 1986).

Como PDGF é uma molécula dimérica, formada por duas isoformas, existe a possibilidade de interação simultânea com duas moléculas do receptor. A ligação das isoformas de PDGF aos seus receptores específicos promove a dimerização dos receptores.

As diferentes formas de PDGF induzem diferentes dímeros do receptor, já que a cadeia A de PDGF é capaz de ligar apenas a receptores do tipo α , enquanto que PDGF B liga-se a receptores tanto do tipo α quanto β . Assim, PDGF-AA é capaz de induzir apenas a formação de homodímeros $\alpha\alpha$ do receptor, a forma PDGF-AB induz as formas $\alpha\alpha$ ou $\alpha\beta$ e PDGF-BB é capaz de induzir as três combinações possíveis (Heldin & Westermark, 1999).

Existem algumas diferenças com relação à transdução de sinal via receptor do tipo $\alpha\alpha$ ou $\beta\beta$. Os efeitos distintos mediados pelas diferentes formas de PDGF podem ser explicados pelas diferenças de interações do seu receptor com os vários domínios SH2 das proteínas celulares. A forma heterodimérica, PDGF-AB, promove uma forte ativação mitogênica nas células que expressam ambas as formas do receptor, sugerindo que o receptor heterodimérico possui características únicas. Uma possível explicação para este efeito é a possibilidade de autofosforilação em resíduos de tirosinas específicos, diferentes quando comparados com o receptor homodimérico. Tem sido visto que o resíduo Tyr-754 no receptor α é fosforilado em maior grau no heterodímero (Rupp *et al.*, 1994), enquanto o resíduo Tyr-771 no receptor β é fosforilado em maior grau em homodímeros do receptor (Ekman *et al.*, 1999)

Os epítomos de interação dos receptores α e β de PDGF com moléculas de PDGF estão localizados nos domínios de homologia a imunoglobulinas, sendo que o domínio Ig2 parece desenvolver um papel importante na mediação desta interação. Além da interação com PDGF, são necessárias interações adicionais

entre as moléculas dos receptores a fim de promover uma maior estabilidade do complexo. O domínio Ig4 parece ter um papel importante na estabilização do complexo possibilitando uma interação receptor-receptor (revisto em Heldin & Westermark, 1999).

A auto-fosforilação do receptor de PDGF, induzida após a dimerização, possui importantes funções. A fosforilação de resíduos conservados de tirosina localizados dentro do domínio quinásico, especificamente Tyr-849 no receptor- α e Tyr-857 no receptor- β , levam a um aumento na atividade catalítica destas quinases, enquanto que a auto-fosforilação de resíduos de tirosinas localizados fora do domínios quinásico gera sítios de interação com moléculas transdutoras de sinal contendo domínios SH2 (Heldin & Westermark, 1999).

O receptor β de PDGF (esquematizado na Fig. 2) quando ativado apresenta pelo menos nove resíduos de tirosinas fosforiladas. A Tyr 857, localizada no domínio quinásico, é importante para a atividade catalítica, enquanto que as outras tirosinas interagem com pelo menos oito proteínas transdutoras de sinal diferentes (Heldin & Westermark, 1999). A especificidade da ligação entre o resíduo de tirosina fosforilado do receptor de PDGF e o domínio SH2 da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) por exemplo, é dada pela sequência p-Tyr-(Val/Met)-X-Met. Mutações sítio-dirigidas nos domínios Tyr⁷⁴⁰-Met-Asp-Met e Tyr⁷⁵¹-Val-Pro-Met do receptor β de PDGF, inibem a ligação de PI3K ao receptor, mas não afetam a ligação de outras proteínas contendo domínios SH2 (Kazlauskas *et al.*, 1992).

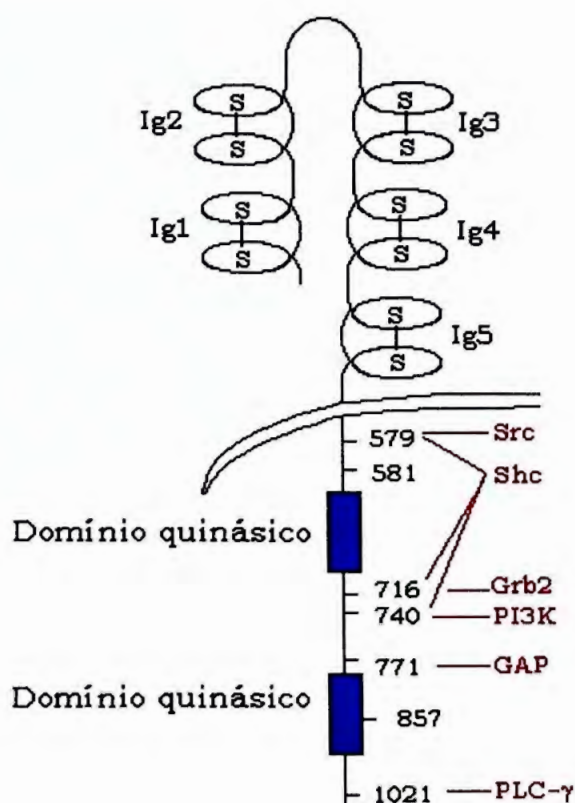


Fig. 2: Representação esquemática do receptor- β de PDGF e proteínas associadas. Na figura estão representados o domínio quinásico do receptor e os domínios de homologia à imunoglobulinas. Os números indicam os resíduos de tirosina fosforilados no receptor ativado, onde proteínas contendo domínios SH2 se ligam. Src, Shc, Grb2, PI3K, GAP e PLC- γ : proteínas transdutoras do sinal mitogênico de PDGF- β

Um grande número de proteínas que contém domínios SH2 têm sido identificadas por interagir com os receptores α e β de PDGF. Muitas destas moléculas possuem atividade enzimática, como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), fosfolipase C- γ (PLC- γ), os membros da família Src de proteínas quinases, a tirosina fosfatase SHP-2 e proteínas ativadoras de GTPase (GAP) de Ras. Outras moléculas como Grb2 e Shc não possuem atividade enzimática, funcionando como moléculas adaptadoras que possibilitam a conexão entre o receptor de PDGF e moléculas sinalizadoras localizadas abaixo do receptor (Heldin & Westermark, 1999).

Os receptores de PDGF não estão uniformemente distribuídos na membrana celular, mas encontram-se concentrados em “*caveolae*” (distintas invaginações da membrana as quais estão envolvidas no processo de endocitose) (Liu *et al.*, 1996).

Após a interação do receptor de PDGF com o ligante, ocorre a internalização do complexo ligante-receptor em endossomos. O complexo PDGF-receptor então é dissociado e o receptor recicla para a membrana plasmática, ou alternativamente, o complexo ligante-receptor é degradado pela fusão dos endossomas com os lisossomas (Sorkin *et al.*, 1991). Além da degradação em lisossomas, o receptor de PDGF também está sujeito a degradação citoplasmática em proteossomas após ubiquitinação (Mori *et al.*, 1995). O processo que leva a degradação dos receptores de PDGF, assim como o processo de reciclagem para a membrana, é um importante parâmetro na regulação da resposta mitogênica.

1.3.2) Interação do receptor de PDGF com moléculas sinalizadoras.

Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). PI3K é formada por uma subunidade regulatória de 85kDa (p85) e uma subunidade catalítica de 110kDa (p110) (Carpenter *et al.*, 1990). O substrato preferencial desta enzima é o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [PI(4,5)P₂] o qual é fosforilado na posição 3 do anel de inositol, gerando moléculas de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5)P₃]. Também são gerados fosfatidilinositol 3,4 bifosfato [PI(3,4)P₂] e fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P) (Rameh *et al.*, 1999) pela fosforilação de fosfatidilinositol 4 fosfato PI(4)P e fosfatidilinositol PI, respectivamente.

A ativação desta enzima por fatores extracelulares envolve o seu recrutamento para a membrana, em geral via interações de seus domínios SH2 com tirosinas fosforiladas (Kapeller & Cantley, 1994). Entretanto, o requerimento de fatores de crescimento para a ativação de PI3K pode ser suprido pela expressão de formas ativas da subunidade catalítica p110 (Hu *et al.*, 1995). Até recentemente, pouco se sabia sobre a função dos produtos fosforilados pela PI3K na proliferação celular. Diversos estudos sugerem que os produtos PI_{3,4}P₂ e PI_{3,4,5}P₃ são importantes reguladores da proliferação celular (Rameh & Cantley, 1999). Estes produtos não são detectáveis em células quiescentes, mas seus

níveis são aumentados rapidamente após estímulo por PDGF (Auger *et al.*, 1989). Tem sido descritos níveis constitutivamente altos de PI3,4P₂ e PI3,4,5P₃ em células transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma, mas não em linhagens celulares não transformadas que expressam formas mutadas desta proteína (Ling *et al.*, 1992).

Os derivados de inositol fosforilados na posição 3 não são hidrolisados pela PLC γ , o que levou a sugestão de que eles podem agir como segundo mensageiros. Foi demonstrado que PI3,4P₂ e PI3,4,5P₃ são capazes de ligar diretamente aos domínios SH2 da PI3K, competindo por este sítio com outras fosfoproteínas (Rameh *et al.*, 1995). Outras proteínas contendo domínios SH2 (como, por exemplo, Src, Lck e Abl), também foram capazes de se ligar a PI3,4P₂ e PI3,4,5P₃ (Rameh *et al.*, 1995). Estes resultados sugerem que os produtos de PI3K podem desempenhar, diretamente, uma função importante na regulação de proteínas transdutoras do sinal mitogênico.

A ativação de PI3K é correlacionada com a ativação da serina/treonina quinase Akt (Franke *et al.*; 1995), ativação de diferentes isoformas de PKC (Toker *et al.*, 1994), ativação da proteína Rac (Hawkins *et al.*, 1995) e da via de transdução de sinal de Ras (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1995). O papel destas moléculas efetoras tem sido muito estudado, podendo ser destacado o papel de Rac na reorganização do citosqueleto de actina (Dudek *et al.*, 1997) e da serina/treonina quinase Akt/PKB desempenhando um papel anti-apoptótico (Hawkins *et al.*, 1995, Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997).

Fosfolipase C- γ (PLC- γ). A interação de PLC- γ com o receptor de PDGF leva a sua fosforilação em resíduos específicos de tirosina, aumentando sua atividade catalítica. Fosfolipase C- γ atua no mesmo substrato de PI3K, isto é, PI(4,5)P₂. Seus produtos, I(1,4,5)P₃ e diacilglicerol (DAG) são responsáveis, respectivamente, pela mobilização de íons Ca²⁺ intracelular de estoques internos, por meio da ligação a receptores específicos no retículo endoplasmático (Berridge & Irvine, 1984) e ativação de certos membros da família de PKC (proteína quinase C) levando à fosforilação de diversas proteínas celulares (Boyle *et al.*, 1991). O íon Ca²⁺, por sua vez, é co-fator na ativação de PKC por DAG (Berridge, 1984).

A co-ativação, dependente de PDGF, de PLC- γ e PI3K resulta em um aumento na geração de inositol trifosfato (IP₃) e aumento na liberação de íons Ca²⁺ intracelulares quando comparado com a seletiva ativação de PLC- γ , sugerindo que o recrutamento de PI3K ao receptor de PDGF e consequente produção de fosfatidilinositol-3-fosfato resulta em um aumento da atividade hidrolítica de PLC- γ . Tem sido visto que PI(3,4,5)P₃ formado por ação de PI3K interage com o domínio PH de PLC- γ e possibilita a ancoragem da enzima na membrana plasmática (Falasca *et al.*, 1998). Ainda, PI(3,4,5)P₃ associa-se com o domínio SH2 C-terminal de PLC- γ , sendo capaz de mediar a dissociação desta molécula do receptor de PDGF ativado (Rameh *et al.*, 1998). A dissociação de PLC- γ do receptor de PDGF, através da produção de PI(3,4,5)P₃, pode estar promovendo a translocação da enzima para a bicamada lipídica, aumentando a disponibilidade do substrato. Desde que PI(3,4,5)P₃ não é hidrolisado por PLC- γ , sua presença na bicamada lipídica pode ainda servir para estabilizar a enzima através da interação com os domínios SH2 e PH de PLC- γ (Rameh *et al.*, 1998).

Família de proteínas Src. Membros da família Src de proteínas tirosinas quinases são caracterizadas pela presença de um domínio SH3, um domínio SH2 e um domínio catalítico. Estão incluídas nesta família, além da proteína Src, as proteínas Fyn e Yes. O aumento de proteínas fosforiladas em tirosina, pelo estímulo com PDGF, é mediado pela interação das proteínas da família Src com o receptor de PDGF, levando a um aumento de 2 a 4 vezes na atividade quinásica de Src, Fyn e Yes (Gould & Hunter, 1988; Kypta *et al.*, 1990). Na sua configuração inativa, o resíduo de tirosina da porção C-terminal da proteína Src está envolvido numa interação intramolecular, que ocorre entre este resíduo de tirosina fosforilado e seu próprio domínio SH2 (Fig 3). Foi verificado que o resíduo Tyr-527 de Src, na porção C-terminal, é fosforilado *in vivo* (Cooper *et al.*, 1986) sendo que a proteína oncogênica v-Src não apresenta este resíduo. Os outros membros desta família de tirosinas quinases, as proteínas Fyn e Yes, também apresentam sítios análogos de fosforilação em tirosinas, os resíduos Tyr-579 e Tyr-581, respectivamente, evidenciando que uma forma de induzir a atividade destas proteínas é através da defosforilação de resíduos de tirosina localizados na porção C-terminal da molécula.

Além da Tyr-527 de Src, outro resíduo de tirosina está envolvido na regulação da atividade quinásica dessa proteína. Em sua conformação inativa, o resíduo Tyr-416 de Src está na forma defosforilada interagindo diretamente no domínio quinásico desta proteína. Quando este resíduo torna-se fosforilado, o mesmo é “deslocado” do domínio quinásico, permitindo o acesso do substrato (Xu *et al.*, 1999, Bjorge *et al.*, 2000) (Fig 3).

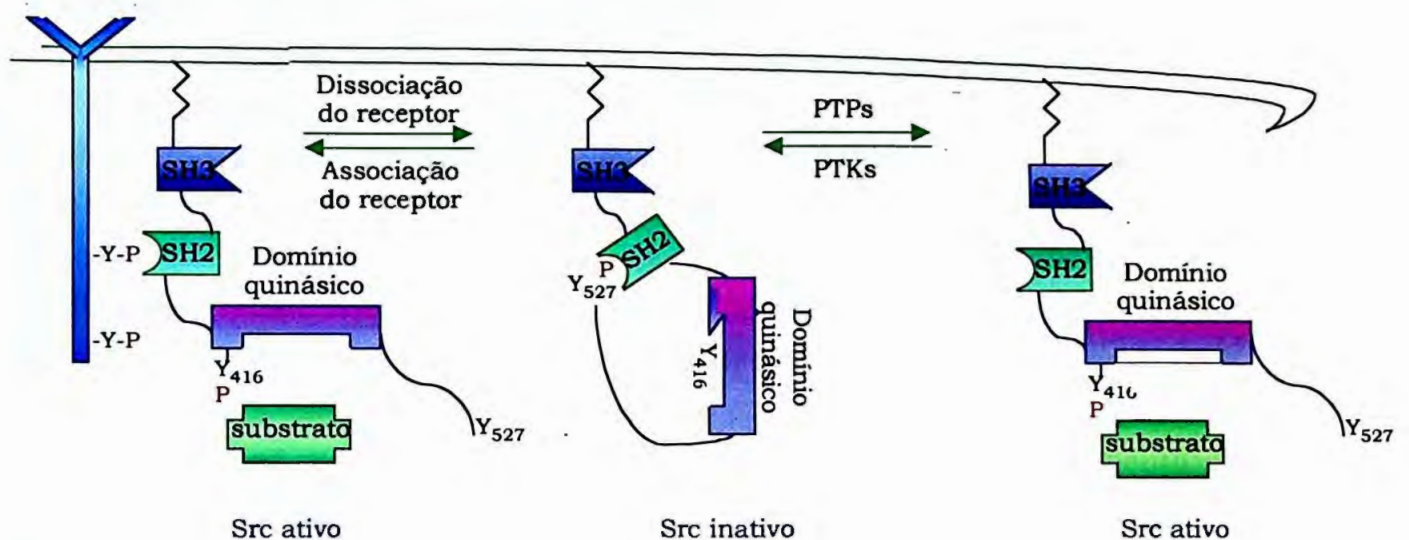


Fig. 3: Mecanismo de ativação da proteína quinase Src. A proteína Src é normalmente mantida na conformação inativa (centro) com a Tyr527 fosforilada inserida no domínio SH2 da própria proteína e a Tyr416 mantida na forma defosforilada. A ligação de Src à tirosina fosforilada dos receptores de fatores de crescimento, via seu domínio SH2, (esquerda) resulta no deslocamento da Tyr527, seguindo a fosforilação da Tyr416 e ativação de Src. A dissociação de Src do receptor promove o restabelecimento das interações intramoleculares, causando a inativação de Src. Ainda, a defosforilação da Tyr527 como resultado da ação de PTPs (direita) interrompe as interações intramoleculares entre este resíduo e o domínio SH2 de Src. Mutações em Src que levam a desestabilização das interações intramoleculares que o mantém na sua conformação inativa, podem resultar na ativação constitutiva de Src.

A interação do receptor de PDGF ativado à proteína Src promove a fosforilação das Tyr-138 (domínio SH3) e Tyr-213 (domínio SH2) de Src (Broome & Hunter, 1997), tendo sido sugerido que a fosforilação desses sítios desestabiliza

as interações intramoleculares necessárias para manter a conformação inativa da proteína c-Src (Bjorge *et al.*, 2000).

A fosforilação/defosforilação do domínio Tyr-527 de Src, e consequente regulação da atividade de c-Src, depende do balanço entre a velocidade com que o fosfato é removido por PTP e a velocidade com que é adicionado por PTKs. Várias PTPs, como SHP-1, SHP-2, têm sido caracterizadas como sendo capazes de defosforilar a Tyr-527 de Src, sendo implicadas na regulação da atividade tirosina quinásica de c-Src (Bjorge *et al.*, 2000).

Proteínas ativadoras de GTPases (GAPs). Proteínas ativadoras de GTPases (GAP) fazem parte de outro grupo de moléculas que interagem com o receptor de PDGF ativo através do resíduo Tyr-771 fosforilado do receptor. Estas proteínas exercem uma regulação negativa de Ras por estimular a sua atividade GTPásica, levando-o de volta à forma inativa (Heldin & Westermark, 1999). Mutações pontuais em Ras, que levam a predominância da forma ativa (ligada a GTP) induzem o seu potencial oncogênico (Bourne *et al.*, 1990).

Schlesinger e colaboradores (1999) observaram que o recrutamento de RasGAP ao receptor β PDGF ativado promove a inibição das vias de PI3K e PLC γ . Para PI3K o mecanismo de inibição envolve a diminuição dos níveis de Ras ativo, enquanto que para PLC γ , RasGAP parece prevenir a fosforilação em tirosina desta proteína. Os autores propõe um mecanismo para este efeito: em células estimuladas por PDGF, é a quinase Src, e não o receptor de PDGF ativo, que medeia a fosforilação de PLC- γ . Quando RasGAP é recrutado ao receptor ocorre um “sequestro” de Src, prevenindo assim a fosforilação de PLC- γ . Esta hipótese traz uma idéia não usual de que Src contribui para a fosforilação de proteínas que são tipicamente consideradas substratos diretos do receptor de PDGF ativo (Schlesinger *et al.*, 1999).

Moléculas adaptadoras. Adaptadores são moléculas que não possuem atividade catalítica intrínseca. Após a ligação com o receptor de PDGF, através de domínios SH2, estas moléculas são capazes de conectar o receptor a moléculas efetoras que se localizam “downstream”. A subunidade regulatória de PI3K (p85)

que forma um complexo com a subunidade catalítica de PI3K (p110) é um exemplo de molécula adaptadora já mencionada anteriormente.

Shc também é uma molécula adaptadora que, após a sua ligação com o receptor de PDGF, torna-se fosforilada na Tyr-317. Esta tirosina pode ser reconhecida pelo complexo Grb2/Sos e, assim, contribuir para a ativação da proteína Ras (descrita a seguir).

Grb2-Sos. Grb2 é uma molécula adaptadora que possui um domínio SH2 e dois domínios SH3, sendo este último o responsável pela interação de Grb2 com Sos. Sos (homólogo da proteína Son of sevenless de *Drosophila*) é um fator de troca de nucleotídeo de Ras o qual converte a forma inativa Ras-GDP para a forma ativa Ras-GTP (Fig. 4) (Li *et al.*, 1993). O domínio SH2 de Grb2 pode interagir diretamente com o receptor de PDGF auto-fosforilado, ou indiretamente via outros componentes como Shc (Kodimangalan *et al.*, 1995).

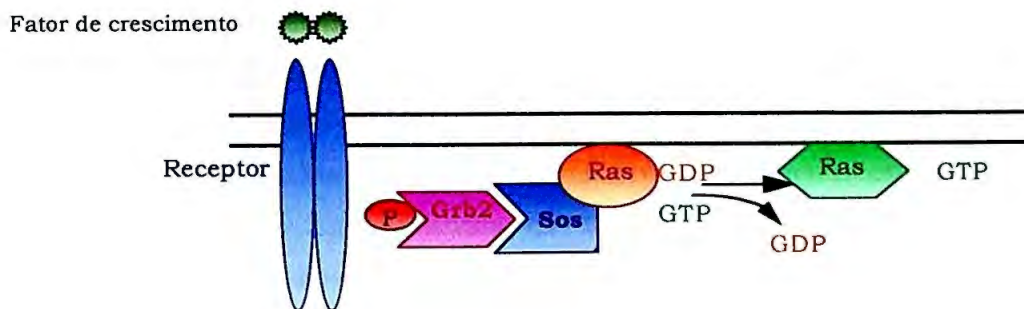


Fig. 4: Esquema da ativação de Ras. A proteína adaptadora Grb2 associa-se ao receptor ativado e ao fator de troca de nucleotídeo Sos. A interação de Sos a Ras promove a troca de GDP e GTP, levando à sua ativação.

Ras constitui uma família de proteínas codificadas pela família de oncogenes *ras*, homólogos celulares dos genes transformantes dos vírus de sarcoma de Harvey (Ha) e Kirsten (Ki). Estas proteínas desempenham um papel importante na proliferação celular desencadeada por fatores de crescimento, já que a microinjeção de anticorpos anti-Ras ou expressão de mutantes dominantes negativos são capazes de inibir a resposta proliferativa em fibroblastos (revisto por Fantl *et al.*, 1993). Em função do potencial oncogênico de *v-ras* e de formas

mutadas de *c-ras*, vários estudos concentraram-se na identificação das proteínas alvos de Ras no controle normal da proliferação celular (Campbell *et al.*, 1998).

Algumas vias ativadas por Ras são denominadas vias de MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) que envolvem uma cascata de quinases, as quais enviam o sinal mitogênico para o núcleo (Campbell *et al.*, 1998). As MAPKs são ativadas por fosforilação em resíduos de treonina e tirosina por uma quinase de especificidade dual, conhecida como MAPK quinase (MAPKK) que, por sua vez, é ativada por fosforilação em resíduos de serina por outra quinase, a MAPKK quinase (MAPKKK). O sinal (MAPKKK→MAPKK→MAPK) é, então, passado adiante, por translocação da MAPK para o núcleo e fosforilação de fatores de transcrição específicos. Entre as vias de MAPKs, a melhor conhecida é a via Ras/Erks, descrita a seguir:

O primeiro passo da via Ras/Erks é a ligação de Ras-GTP à serina/treonina quinase Raf (homólogo de *v-Raf* - produto do gene transformante *v-raf* do vírus de sarcoma murino 3611) (Zhang *et al.*, 1993); entretanto, esta associação por si só, não promove ativação de Raf, mas permite a sua localização na membrana plasmática onde mecanismos de ativação, ainda não determinados, podem ocorrer. Através da fosforilação de resíduos específicos de serina, Raf ativa MEK-1 ou MEK-2 (quinases de MAPKs/Erks) as quais, por sua vez, ativam Erk-1 e Erk-2 (quinases reguladas por sinais extracelulares, pertencentes à família de MAPKs) por fosforilação em resíduos de treonina e tirosina. No seu estado ativado, as Erks são capazes de passar para o núcleo, onde catalisam a fosforilação de fatores de transcrição como, por exemplo, o fator de transcrição Elk-1 (quinase de homologia a *ets 1*) (Campbell *et al.*, 1998).

Um outro exemplo de indução de via de MAPKs por Ras, é dado pela ativação de uma outra MAPKKK (que não Raf), resultando na fosforilação de JNK (quinase da região N-terminal de Jun, pertencente à família das MAPKs) (Hibi *et al.*, 1993, Minden *et al.*, 1994) a qual regula, por fosforilação, a atividade de Jun, um dos componentes do fator de transcrição AP-1 (descrito a seguir). A via das MAPKs ativadas por Ras está exemplificada na Fig 5.

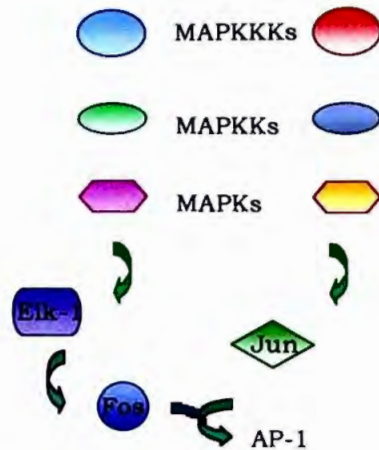


Fig. 5: Representação esquemática das vias de MAPKs. Através de fosforilação sequencial das MAPKs, o sinal é passado para o núcleo, fosforilando fatores de transcrição como Elk-1 e AP-1.

É importante ressaltar que existe um “cross-talk” entre as vias de Ras e PI3K, as quais interagem podendo uma ativar a outra (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1995, Campbell *et al.*, 1998).

1.3.3) Interação do receptor de PDGF com proteínas tirosinas fosfatases.

O balanço entre fosforilação e desfosforilação de proteínas é um dos pontos chave para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares como fatores peptídicos de crescimento e hormônios. Em particular, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de tirosina em proteínas têm emergido como um evento crucial na regulação da divisão, diferenciação e expressão gênica (Byon *et al.*, 1997).

As fosfotirosina proteína fosfatases (PTPs) constituem uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise de resíduos de fosfotirosinas presentes em proteínas e peptídeos, sendo implicadas no controle da proliferação e diferenciação celular (Ramponi & Stefani, 1997). A ação catalítica das PTPs contrapõe-se à atividade das PTKs envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular. Devido à ação anti-proliferativa de várias PTPs, os genes

codificadores destas enzimas têm sido considerados como genes supressores de tumor.

A proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP) tem sido implicada no controle do ciclo celular (Granjeiro *et al.*, 1997; Ramponi e Stefani, 1997). Embora o substrato natural desta isoforma, bem como seu papel fisiológico, não tenha sido completamente determinado, tem sido sugerido seu envolvimento na desfosforilação do receptor do PDGF (Berti *et al.*, 1994; Chiarugi *et al.*, 1995; Bucciantini *et al.*, 1998).

As LMW-PTP são onipresentes em seres vivos, de procariotos a mamíferos, onde parecem desempenhar diferentes funções (Ramponi e Stefanni, 1997). Em mamíferos, foram identificadas duas isoformas originadas a partir do "splicing" alternativo do mesmo mRNA, os quais diferem somente na região entre os resíduos de aminoácidos 40 a 73 (Ramponi e Stefanni, 1997). Tais isoformas foram denominadas de "fast" (f) ou "slow" (s) com base no distinto padrão de mobilidade eletroforética ou, alternativamente, como IF1 (Isoforma 1 ou a) e IF2 (Isoforma 2 ou b), respectivamente.

A LMW-PTP não apresenta sequências com homologia a outras PTPs, contudo, possui a sequência consenso do sítio ativo desta classe de enzima, consistindo de uma cisteína e uma arginina separadas por cinco resíduos de aminoácidos ($C_{12}XXXXXR_{18}$, onde X representa qualquer resíduo de aminoácido), e um mecanismo catalítico idêntico a todos os membros da família de PTPs.

A LMW-PTP está presente no citoplasma e interage especificamente com o receptor de PDGF ativado através do seu sítio ativo. De fato, a LMW-PTP é capaz de ligar especificamente e defosforilar o receptor de PDGF ativado, modulando a mitogênese induzida por PDGF. Foi verificada uma diminuição em até 90% na resposta mitogênica ao PDGF e diminuição no nível de auto-fosforilação do seu receptor após a superexpressão da isoforma IF2 desta enzima em células NIH3T3 (Berti *et al.* 1994).

A mutação no resíduo de $Cys_{12} \rightarrow Ser$, presente no sítio ativo da LMW-PTP, promove a completa perda da atividade catalítica desta enzima, contudo este mutante ainda é capaz de interagir com o substrato, funcionando como um dominante-negativo da enzima (Chiarugi *et al.*, 1995).

Os efeitos da LMW-PTP nas vias de sinalização relevantes para a síntese de DNA dependente do estímulo por PDGF foram analisados mediante a transfecção de uma construção contendo o cDNA da LMW-PTP ativa ou um dominante negativo desta proteína em células NIH3T3. Sob estímulo com PDGF as células transfectadas com o mutante dominante negativo da LMW-PTP mostraram um aumento da ativação de Src, enquanto que a LMW-PTP ativa induziu uma redução da ativação deste proto-oncogene, por prevenir a interação de Src ao receptor de PDGF ativo. Estes efeitos foram associados com mudanças na expressão de *c-myc* (Chiarugi *et al.*, 1998). Ainda, a LMW-PTP tipo selvagem ou mutante dominante-negativo parecem regular diferencialmente a ativação e fosforilação das proteínas STAT1 e STAT3, sendo associadas essas modificações com mudanças na expressão do gene *c-fos* (Chiarugi *et al.*, 1998).

Outras vias envolvidas na mitogênese induzida por PDGF, como fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) ou fosfolipase C- γ (PLC- γ) não foram afetadas pela expressão da proteína LMW-PTP. Estes dados indicam que esta fosfatase seletivamente interfere com as vias de Src e STATs na sinalização “downstream” à PDGF. Em particular, a LMW-PTP está envolvida em vias que regulam a transcrição dos genes de resposta primária ao estímulo por fatores de crescimento, *myc* e *fos*.

A atividade da LMW-PTP no controle da proliferação celular é regulada por fosforilação mediada por quinases da família Src (Rigacci *et al.*, 1996; Tailor *et al.*, 1997). Os resíduos fosforilados na LMW-PTP são Tyr-131, que provoca um aumento expressivo da atividade catalítica (25 vezes), e/ou Tyr-132 (Bucciantini *et al.*, 1999). Recentemente, foi proposto que a LMW-PTP poderia formar um dímero onde a Tyr-131 e Tyr-132 estariam inseridas no sítio ativo de outro monômero, podendo representar um mecanismo de auto-regulação (Tabernerero *et al.* 1999).

Recentemente, foi verificado que a LMW-PTP presente constitutivamente no citoplasma, apresenta uma fração associada ao citoesqueleto (Rigacci *et al.*, 1998; Cirri *et al.*, 1998). Após o estímulo por PDGF, c-Src é capaz de interagir e fosforilar somente a LMW-PTP presente na fração associada ao citoesqueleto, levando ao aumento (cerca de 20 vezes) da atividade catalítica da LMW-PTP (Cirri *et al.*, 1998).

A fosforilação da LMW-PTP por c-Src, após o tratamento por PDGF, influencia fortemente a adesão e migração celular, sendo identificado um novo substrato da LMW-PTP localizado no citoesqueleto: p190Rho-GAP (Chiarugi *et al.*, 2000).

Desta maneira, a LMW-PTP desempenha múltiplos papéis na mitogênese induzida por PDGF, desde que pode interagir diretamente com o receptor de PDGF e promover sua defosforilação. Ao mesmo tempo, a fração da LMW-PTP associada ao citoesqueleto é capaz de controlar o rearranjo do citoesqueleto em resposta ao estímulo por PDGF, por meio da regulação do estado de fosforilação de RhoGAP.

Ambas as isoformas da LMW-PTP são inativadas por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que age diretamente no seu sítio ativo promovendo a oxidação de duas cisteínas: Cys 12 e Cys 17, levando à formação de uma ponte dissulfeto e mudança conformacional (Caselli *et al.*, 1998). Como a inativação da enzima por H_2O_2 foi promovida sob concentrações fisiológicas do peróxido, é sugerido que condições de estresse oxidativo e outros processos celulares que produzam peróxido de hidrogênio regulem a atividade da LMW-PTP na célula.

1.4) Complexo de transcrição AP-1.

As células respondem a estímulos do meio, por exemplo, aos fatores de crescimento, por ativação ou repressão da expressão de genes específicos. O processo de transcrição, onde o produto de RNA é produzido a partir da molécula de DNA, é um processo essencial para a regulação da expressão gênica. A transcrição é um processo finamente regulado, que permite que diferentes tipos celulares respondam de forma específica a um determinado estímulo, resultando na expressão de genes específicos.

Diversos estudos de genes eucarióticos, focalizando a região imediatamente “upstream” em relação à região transcrita, puderam identificar sequências no DNA envolvidas com a transcrição basal e com a regulação deste processo (Latchman, 1995a). Um gene eucariótico típico possui quatro distintos elementos controladores da transcrição (Fig. 6). Primeiro, o próprio promotor, que pode conter uma região conhecida como TATA box (TATAA/TAA/T) a qual está

localizada aproximadamente 30 pares de base “upstream” em relação ao sítio de início transcricional de muitos genes. É nesta região que se ligam diversas proteínas essenciais para a transcrição, assim como a própria RNA polimerase (enzima responsável pela transcrição dos genes codificadores de proteínas). Segundo, os chamados elementos “upstream” em relação ao promotor (UPE), localizados próximos ao promotor dos genes, requeridos para o processo de transcrição em qualquer tipo celular, como por exemplo o chamado CAAT box. Terceiro, os elementos regulatórios, responsáveis pela ativação ou repressão da transcrição de determinados genes em tecidos específicos ou em resposta a determinados estímulos. Por último, os elementos mais distantes do promotor, conhecidos como elementos enhancers, os quais podem regular a expressão gênica de determinados genes (Latchman, 1995a). Estes elementos estão representados na figura 6.

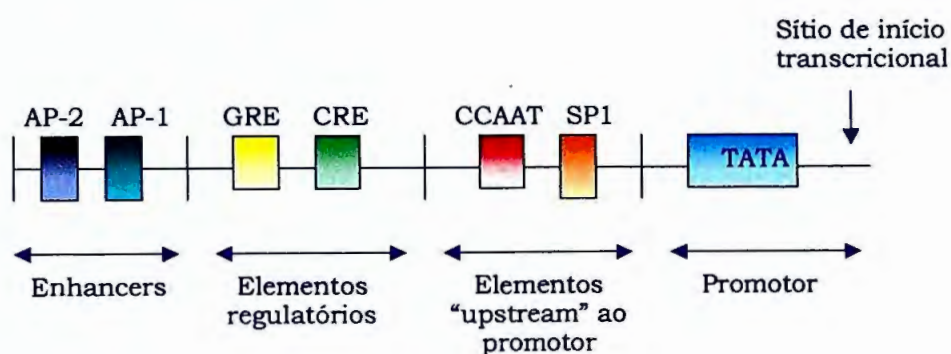


Fig. 6: Estrutura de um gene típico. A região promotora contém TATA box, elementos “upstream” em relação ao promotor como CCAAT box, elementos regulatórios que induzem ou reprimem a expressão em resposta a determinados tratamentos, como glicocorticóides (GREs) e cAMP (CRE), além de outros elementos mais distantes do promotor – enhancers.

O complexo de transcrição AP-1 foi primeiro identificado como um fator de transcrição que se liga, especificamente, a elementos-*cis* no promotor do gene da metalotioneína IIa humana. Posteriormente, o sítio de ligação de AP-1 no DNA foi reconhecido como o elemento de resposta a TPA (13-acetato de 12-*o*-tetradecanoil forbol, indutor de tumor) presente em vários genes celulares e virais, incluindo o gene da colagenase humana e interleucina 2 (IL-2). A comparação de vários TREs

(elementos responsivos a TPA) levaram à identificação da sequência consenso reconhecida por AP-1: 5'-TGAG/CTCA-3'. A inserção de oligonucleotídeos sintéticos correspondentes ao sítio de ligação de AP-1 no promotor da timidina quinase, torna-o responsivo a TPA, enquanto que sequências mutadas em regiões importantes para a ligação de AP-1, não exercem este efeito. Estes fatos contribuíram para o estabelecimento do papel de AP-1 no controle da transcrição basal e induzível de vários genes. É importante ressaltar, entretanto, que o elemento AP-1 é apenas um dos elementos-*cis* que participam da regulação da transcrição de genes por fatores externos. Outros elementos incluem SRE (elemento responsivo ao sorro), o sítio de ligação de NF κ B (Fator nuclear κ de células B) e o sítio de ligação de AP-2 (proteína ativadora -2) (Angel & Karin, 1991).

A composição do complexo de transcrição AP-1 é heterogênea. Ambas as famílias de proteínas nucleares Fos e Jun podem participar da formação do complexo na forma de homo ou heterodímeros os quais se ligarão à sequência responsiva a AP-1 no DNA, modulando a expressão de seus genes alvos (Angel & Karin, 1991). A família Fos é constituída por quatro proteínas: c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2, enquanto que a família Jun inclui três membros: cJun, JunB e JunD.

A composição do complexo AP-1 depende da proporção relativa das diferentes proteínas presentes nas células em um dado momento, sob determinadas condições. As proteínas da família Fos não são capazes de formar dímeros entre si, sendo capazes de formar dímeros apenas com os componentes da família Jun. Por outro lado, as proteínas Jun identificadas até o presente, formam homo e heterodímeros entre si (ex. cJun-cJun ou cJun-JunB) assim como heterodímeros com os componentes da família Fos. Assim, as proteínas Fos isoladamente não são capazes de se ligar ao DNA e ativar a transcrição; entretanto, formam dímeros altamente estáveis com as proteínas Jun, os quais apresentam atividade de ligação ao DNA maior que os dímeros Jun (Smeal *et al.*, 1989; Latchman, 1995b).

Experimentos de mutagênese sítio-dirigida indicam que a dimerização das proteínas Jun e Fos ocorre por interações hidrofóbicas entre regiões conhecidas como zíper de leucina, comum às duas famílias de proteínas. O zíper de leucina é um domínio estrutural que forma uma α hélice na qual os resíduos de leucina

são separados por intervalos de seis aminoácidos (Landschulz *et al.*, 1988, Latchman, 1995c). Desta forma, as cadeias laterais das leucinas formam uma superfície hidrofóbica que medeia a dimerização. Além das interações hidrofóbicas, pontes salinas também fazem parte da interação, proporcionando a estabilidade dos dímeros. Assim, apesar de outras proteínas como cMyc, CREB e mesmo Fos apresentarem zíper de leucinas, somente Fos é capaz de gerar dímeros com proteínas Jun.

Alguns estudos realizados *in vitro* mostram que a maior atividade de ligação ao DNA dos dímeros Fos:Jun é devida a sua maior termo-estabilidade em relação aos dímeros Jun:Jun. Enquanto Fos:Jun dissociam-se em temperaturas entre 37°C e 42°C, Jun:Jun dissociam-se entre 25°C e 37°C. Por outro lado, dímeros cFos:cFos não ocorrem mesmo a 4°C. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de cFos apresentar grande quantidade de resíduos com cargas negativas na região do zíper de leucina, que provoca a repulsão entre essas proteínas. Estes mesmos resíduos são responsáveis pelo grande número de pontes salinas formados com os resíduos básicos presentes no zíper de leucina das proteínas Jun (Landschulz *et al.*, 1988, Latchman, 1995c).

A dissociação de dímeros Jun:Jun entre 25°C e 37°C *in vitro*, abre a questão da formação desses dímeros *in vivo*. Entretanto, a co-transfecção de *cjun* e de um vetor contendo um “gene repórter” sob controle de um promotor com a sequência AP-1 em células F9 (que não expressam quantidades detectáveis de proteínas Fos) leva à uma forte ativação deste promotor (Angel *et al.*, 1989).

Enquanto o zíper de leucina medeia a dimerização entre as proteínas, a interação com o DNA ocorre através de um domínio básico, constituído de grande quantidade de resíduos com cargas positivas. Esta região é altamente conservada entre as proteínas Fos e Jun e mesmo entre outros fatores de transcrição que interagem com sequências similares a TRE (por exemplo, CREB) (Latchman, 1995).

A fosforilação de resíduos de Ser-63 e Ser-73 na porção N-terminal das proteínas Jun por JNKs, proteínas quinases N-terminal de Jun - membros da família de proteínas ativadoras de mitógenos (MAPKs), aumenta a sua capacidade de transativação (Pulverer *et al.*, 1991, Minder *et al.*, 1994).

A composição do complexo AP-1 difere em várias situações fisiológicas da

célula. Uma possível explicação é que mudanças na composição ou estado de fosforilação das proteínas que compõem o complexo de transcrição AP-1 podem modular a atividade transcricional de determinados genes ou ainda modificar seus genes alvos. Dependendo da composição do dímero, diferentes sequências *cis* no DNA são preferencialmente reconhecidas (Latchman, 1995). Foi demonstrado, recentemente, que durante o processo de apoptose, em células C6 de glioma de rato, ocorrem mudanças na composição do complexo de transcrição AP-1, associadas à ativação das vias de sinalização de JNK e com a consequente fosforilação das proteínas cJun e ATF-2 (Pyrzynska *et al.*, 2000).

Normalmente, os níveis de Fos e Jun aumentam transitoriamente nas células tratadas com fatores de crescimento, resultando em um breve estímulo para o crescimento. Contínuos aumentos destas proteínas, como o que ocorre em células infectadas por determinados vírus, podem resultar em células que exibem um crescimento descontrolado contínuo, as quais não estão sujeitas ao controle normal do crescimento.

No contexto celular, a ativação ou repressão de determinados genes não é resultante apenas da ação de um fator de transcrição, havendo interações entre eles, levando à diferentes respostas celulares. Além do papel central na resposta ao crescimento celular normal, o sistema Fos-Jun (AP-1) parece representar um alvo para outros oncogenes. Assim, por exemplo, o oncogene *ets* codifica um fator de transcrição conhecido como PEA3, cujo sítio responsivo está localizado adjacente ao sítio AP-1 em diversos genes responsivos a TPA (como colagenase), que parece cooperar com Fos e Jun para produzir altos níveis de ativação destes promotores (Latchman, 1995). Além da interação positiva com outros fatores, o complexo AP-1 pode também inibir a ação de outros fatores de transcrição, como por exemplo, o receptor de glicocorticóide ativado (Jonat *et al.*, 1990).

Os receptores de glicocorticóides (GR) promovem repressão de determinados genes através de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição. O hormônio glicocorticóide tem sido descrito como um potente bloqueador da indução do gene da colagenase por ésteres de forbol, resultando em um efeito anti-inflamatório. Este bloqueio é mediado pelo receptor de glicocorticóide, o qual abole a ligação das proteínas Fos e Jun aos sítios AP-1 de genes, como o da colagenase (ver Fig. 7, adaptada de Latchman, 1995).

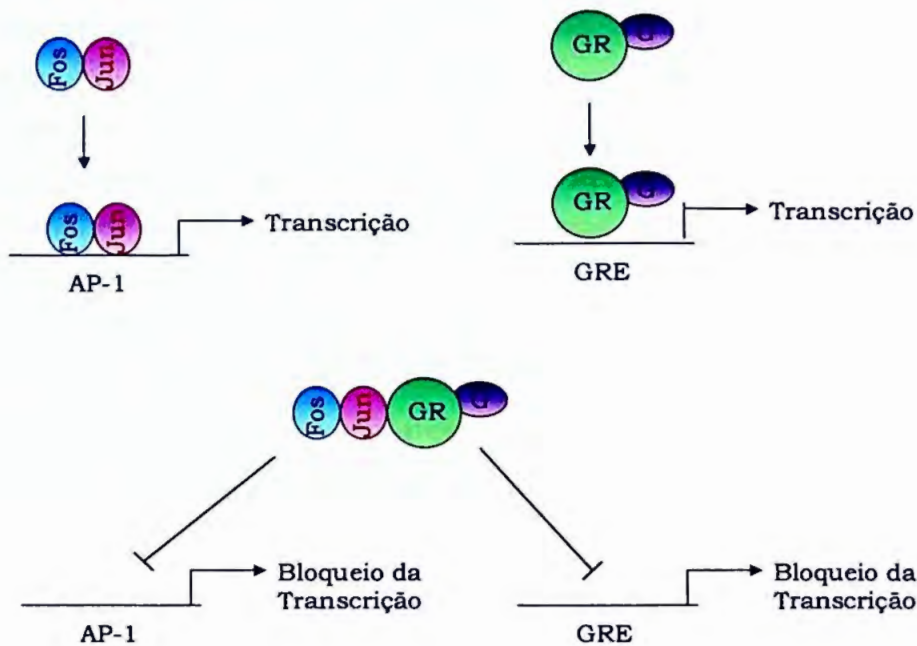


Fig. 7: Transrepressão mútua de Fos/Jun e receptor de glicocorticóide. A formação do complexo proteína-proteína entre Fos/Jun e o receptor de glicocorticóide ativado pela interação ao hormônio inibe a expressão dos genes que contém sítios de ligação a estas proteínas Fos/Jun (sítio AP-1) e ao receptor de glicocorticóide (GRE) por evitar que estas proteínas se liguem a estes sítios e ativem a transcrição.

Assim, os produtos dos oncogenes *fos* e *jun* desempenham um papel crítico na regulação da expressão de genes celulares específicos no controle do crescimento de células normais, interagindo com produtos de outros fatores de transcrição para produzir uma atividade controlada dos seus genes alvos, a qual é necessária para o controle normal do crescimento celular.

1.5) Vírus polioma – modelo de transformação celular.

Os vírus tumorais de DNA (polioma, SV40, papiloma) e de RNA (retrovírus causadores de leucemias e sarcomas) têm sido empregados como modelos de estudo para desvendar as bases moleculares da transformação maligna que leva à formação de tumores.

Diferentemente dos retrovírus, para os quais homólogos celulares dos oncogenes virais são conhecidos, nenhum homólogo celular tem sido encontrado para os vírus tumorais de DNA.

O vírus polioma, pertencente à família dos Papovavirus, foi primeiro descrito por Ludwig Gross em 1953, quando analisava a indução de leucemias em camundongos por ação do vírus de leucemia murino (MLV). A ocorrência de outros tipos de tumores levou ao isolamento de um contaminante em suas preparações, o qual foi denominado polioma por causar tumores em diferentes tecidos. A capacidade do vírus polioma de induzir tumores somente quando inoculado em camundongos recém-nascidos, sugere que, na natureza, este vírus só tem ação oncogênica quando infecta animais logo após o nascimento (Kaplan *et al.*, 1988).

As linhagens celulares transformadas pelo vírus polioma apresentam alterações características que incluem a diminuição do requerimento de soro para o crescimento, aumento da densidade de saturação, capacidade de crescer em meio semi-sólido e de induzir tumores quando inoculadas em animais (Oliveira, 1997).

O vírus polioma se destaca por possuir um genoma reduzido, constituído de DNA dupla fita circular e por ser capaz de reproduzir *in vitro* o processo de gênese tumoral, possibilitando a sua utilização como modelo de estudo da transformação de fibroblastos em cultura (revisto por Benjamin & Vogt, 1990).

O genoma do vírus polioma é constituído por aproximadamente 5,0 kb, sendo dividido em duas regiões:

- a) região “early”, que codifica proteínas acumuladas antes da replicação do DNA viral.
- b) região “late”, que codifica proteínas acumuladas após a replicação do DNA viral (Eckhart, 1989).

A região “early” do vírus polioma codifica três proteínas envolvidas na transformação celular, os chamados antígenos tumorais (antígenos T), que diferem em tamanho, a saber: LT- “large T”, MT- “middle T” e ST- “small T”. Os três antígenos tumorais são gerados a partir de processamento diferencial do mesmo mRNA. Assim, a sequência codificadora da região N-terminal destas

proteínas é idêntica, enquanto que a região C-terminal difere em cada uma, já que o processamento diferencial do mRNA gera diferentes fases de leitura (Fig. 8).

A região “late” codifica as proteínas estruturais, VP-1, VP-2 e VP-3, que vão fazer parte do capsídeo viral (Fig. 8).

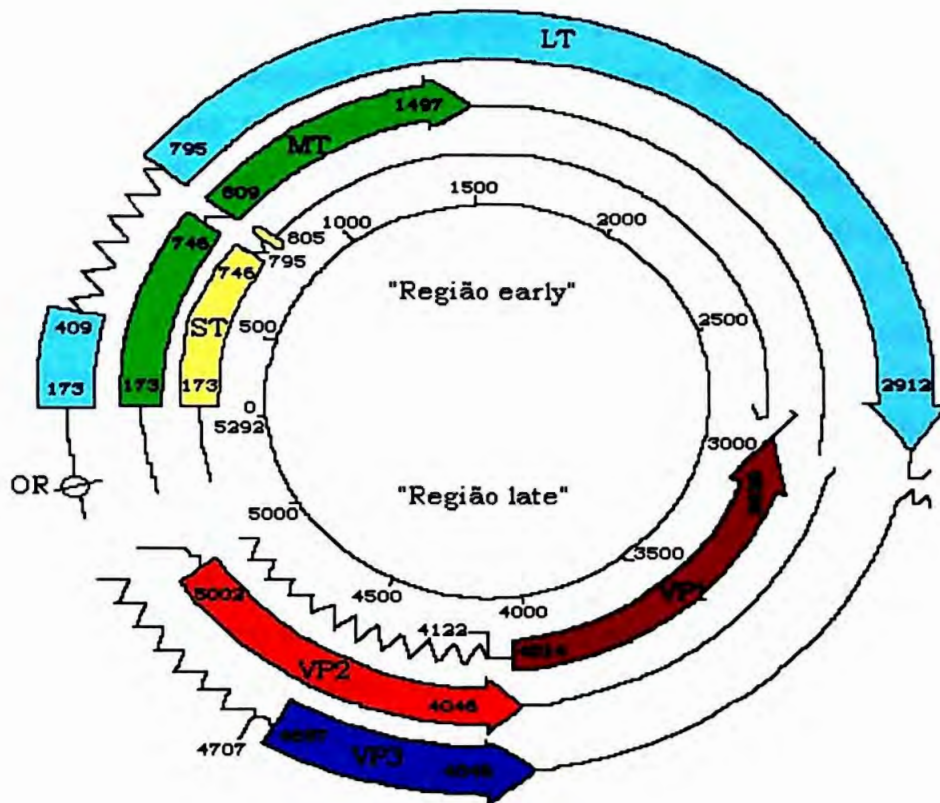


Fig. 8: Mapa representativo do genoma do vírus polioma (círculo interno). Os transcritos codificados pelas regiões “early” (LT, MT e ST) e “late” (VP1,VP2 e VP3) estão representados pelos círculos externos. VVV = “introns”; ⇒ = fase de leitura; OR = origem de replicação.

O papel de cada antígeno T durante a transformação celular *in vitro* foi analisada através de mutantes virais (Schlegel & Benjamin, 1978). Estes estudos mostraram que MT e LT são necessários para a manutenção do fenótipo transformado enquanto que, vírus mutantes que expressam apenas ST não apresentam fenótipo transformante. Através do uso de vetores de expressão para mamíferos, contendo o cDNA de cada um dos três antígenos T, foi possível

demonstrar que a expressão combinada de LT e MT é necessária e suficiente para transformar culturas primárias (Rassoulzadegan *et al.*, 1982).

1.5.1) O antígeno LT

LT é uma proteína de 98kDa capaz de se ligar a sequências específicas de DNA, presentes na origem de replicação do DNA viral, sendo um importante regulador negativo da transcrição da região “early” (Farmerie & Folk, 1984) e positivo da região “late” (Kern *et al.*, 1986).

A proteína LT localiza-se no núcleo de células infectadas pelo vírus, sendo capaz de imortalizar fibroblastos primários em cultura (Rassoulzadegan *et al.*, 1982).

No núcleo, LT associa-se ao produto do gene supressor de tumor RB. Vírus mutantes que expressam uma forma de LT incapaz de ligar a RB, mas que apresentam o antígeno MT íntegro, são incapazes de imortalizar culturas primárias (Freund *et al.*, 1992) mas são ainda capazes de transformar linhagens previamente estabelecidas, indicando que a ação de MT é crítica para a transformação celular.

Usando mutantes termo-sensíveis dos antígenos LT dos vírus SV40 e poliomia, Zheng e colaboradores (1994) mostraram que o estabelecimento da imortalização é devido a um bloqueio da apoptose (morte celular programada) nas linhagens celulares. No caso de LT de SV40, isto pode ser explicado pela ligação de LT ao produto do gene supressor de tumor p53, que participa do processo de morte celular programada. Com relação ao LT do vírus poliomia, que não se associa a p53, a imortalização pode ser resultado do bloqueio de uma via de apoptose mediada por outras moléculas ainda não identificadas (Zheng *et al.*, 1994).

A proteína LT mutada, defectiva para a interação com RB, mostra-se incapaz de superar a parada de crescimento promovida por p53, indicando que a interação de LT com a proteína RB é necessária para que a proteína LT interfira com a ação de p53, levando a imortalização celular (Doherty & Freund, 1997).

1.5.2) O antígeno ST

A proteína ST (22kDa) localiza-se no citoplasma de células infectadas pelo vírus e, como MT, é capaz de se ligar à proteína fosfatase PP2A. Em geral, ST não é necessário nem suficiente para a transformação celular, apesar de causar alterações, como aumento da densidade de saturação e mudanças na organização do citoesqueleto celular (Liang *et al.*, 1984).

O antígeno ST é capaz de promover a progressão das células através do ciclo celular de maneira dependente da sua associação com a proteína PP2A. Esta observação sugere que PP2A exerce diferentes papéis em associação com os diferentes antígenos tumorais do vírus polioma, já que a progressão do ciclo celular mediada pelo antígeno MT do vírus polioma requer além da interação MT/PP2A, também a interação de MT com as proteínas celulares PI3K e PLC- γ (Mullane *et al.*, 1998).

1.5.3) O antígeno MT

MT é uma fosfoproteína de aproximadamente 56 a 58 kDa (dependendo do grau de fosforilação) localizada na parte interna da membrana plasmática de células infectadas pelo vírus.

A função de MT no ciclo lítico do vírus parece estar relacionada à montagem do capsídeo, uma vez que induz a fosforilação da proteína VP1 em resíduos de treonina (Li & Garcea, 1994).

Uma região de aproximadamente 22 aminoácidos na porção C-terminal de MT é essencial para a localização de MT na membrana celular (Carmichael *et al.*, 1982) sendo que sua deleção leva à perda da capacidade transformante (Novak & Griffin, 1981).

O antígeno MT pode ser fosforilado em resíduos de serina, localizados na região C-terminal da molécula, assim como em resíduos de treonina e tirosina presentes ao longo da proteína. A fosforilação em resíduos de serina pode ser regulada por PKC, já que o tratamento de linhagens celulares que expressam MT com agentes indutores de PKC (TPA, por exemplo) leva a um aumento destes resíduos fosforilados. A fosforilação pode ser detectada em imunoprecipitados

contendo o antígeno MT, incubados com ^{32}P - γ -ATP, em tampão próprio para a atividade de quinases. Entretanto, esta atividade quinásica não parece ser intrínseca de MT já que MT sintetizado por tradução *in vitro*, expresso em bactérias ou células de insetos, não apresenta atividade de quinase. Além disso, MT não apresenta os domínios de ligação a ATP ou a sequência comum aos domínios quinásicos (Hanks *et al.*, 1988; revisto por Kaplan *et al.*, 1988). Estas observações levaram à procura de proteínas celulares que estariam associadas ao antígeno MT.

1.5.3.1) Associação de MT à proteínas celulares

A análise de imunoprecipitados de MT por eletroforese mono ou bi-dimensional em géis de poliacrilamida (Courtneidge & Smith, 1983; Pallas *et al.*, 1988), juntamente com a geração de inúmeros mutantes (Morgan *et al.*, 1988; Druker & Roberts, 1991) levaram à identificação de diversas proteínas celulares associadas a MT (Courtneidge & Smith, 1983, Pallas *et al.*, 1988, 1990 e 1994, Campbell *et al.*, 1994, Dilworth *et al.*, 1994, Su *et al.*, 1995) (Fig. 9).

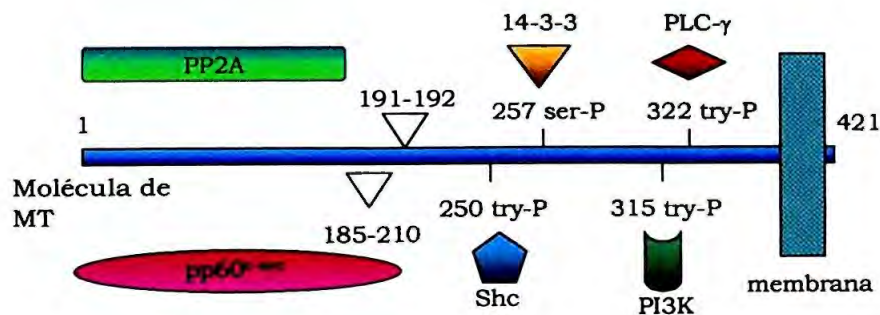


Fig. 9: Representação esquemática da proteína MT do vírus polioma. Os resíduos de tirosina/serina fosforilados onde proteínas contendo domínios SH2 interagem estão indicados.

Através da modulação da atividade destas proteínas (que participam da transdução do sinal mitogênico normal) MT é capaz de induzir a transformação celular (revisto por Armelin & Oliveira, 1996, Oliveira *et al.*, 1999). A associação de MT às proteínas celulares é, em geral, mediada por interações entre domínios SH2 e tirosinas fosforiladas.

Interação MT/Src: A região de MT que é responsável pela interação com a proteína Src foi mapeada na porção N-terminal da molécula de MT, sendo que nesta região também ocorre a interação MT/PP2A (Pallas *et al.*, 1990, Campbell *et al.*, 1995).

Outra região de MT (aa 185-210), que não interage com PP2A, foi definida como sendo necessária para a associação MT/Src (Brewster *et al.*, 1997). A interferência de fosforilação nos resíduos de aminoácidos dessa região sugerem um mecanismo de interação MT/Src pelo qual não é requerido fosforilação (Glover *et al.*, 1999). Através de ensaios de mutagênese sítio dirigida, tem se sugerido que PP2A pode promover a interação MT/quinases da família Src através da defosforilação nos resíduos de Ser195 e Thr203 de MT (Glover *et al.*, 1999).

A associação de MT à proteína Src (Fig. 10) (próxima ao resíduo de Tyr-527 de Src - aminoácidos 519-525) (Dunant *et al.*, 1996) promove a desfosforilação do resíduo Tyr-527 (sítio que regula negativamente a atividade quinásica de Src) e auto-fosforilação do resíduo Tyr-416 de Src (Kaech *et al.*, 1991), levando à sua constante ativação.

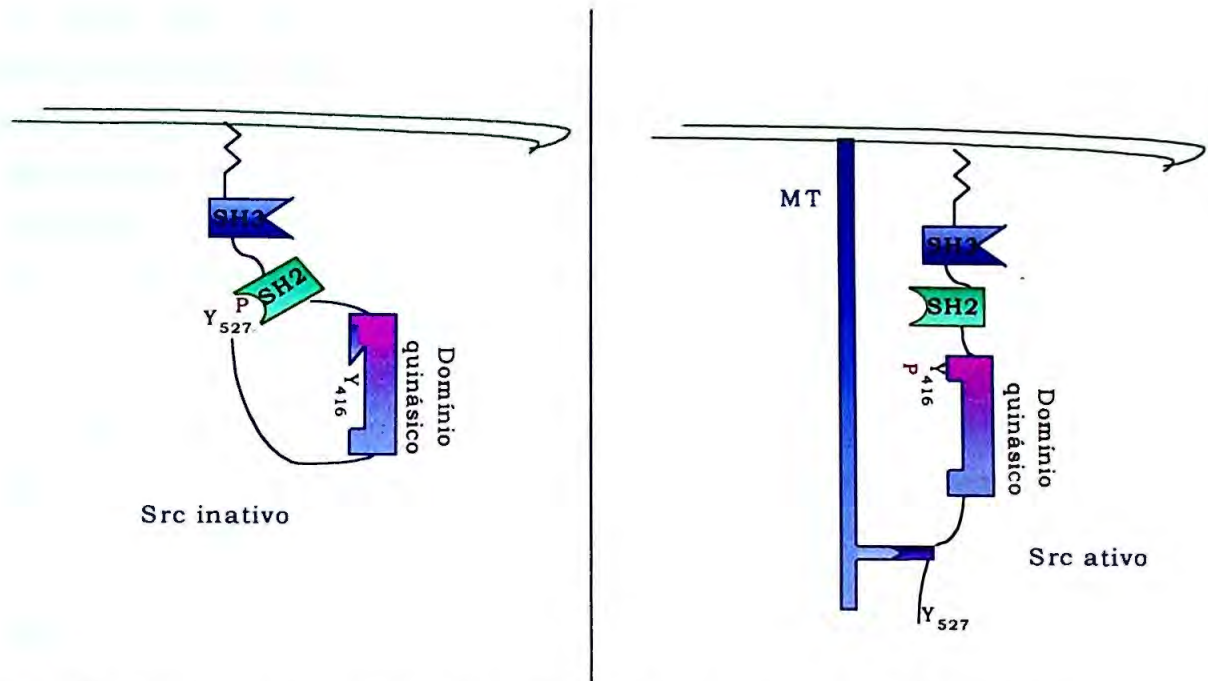


Fig. 10: Associação do antígeno MT à proteína Src. A fosforilação do resíduo de tirosina 527 de Src, induz a forma inativa da proteína (painel esquerdo). Quando expresso em linhagens celulares, o antígeno MT associa-se à porção C-terminal de Src através de sua porção N-terminal. O resíduo de tirosina 527 de Src permanece desfosforilado no complexo MT/Src, levando a uma conformação ativa (painel direito).

Durante muito tempo, a transformação celular induzida pelo vírus polioma (e antígeno MT) esteve relacionada, principalmente, à sua capacidade de se associar e induzir a atividade de tirosinas quinases da família Src, como a própria Src (Courtneidge & Smith, 1983), Fyn (Cheng *et al.*, 1988) e Yes (Kornbluth *et al.*, 1987). Porém, foram descritos vários mutantes de MT defectivos para a transformação, mas ainda capazes de ligar e ativar Src (Druker & Roberts, 1991, Oliveira, 1997, Oliveira *et al.*, 1998). Além disso, foi observado que MT é capaz de transformar linhagens celulares que não expressam Src, além de induzir tumores em camundongos “Src negativos” (Thomas *et al.*, 1993), indicando que esta associação não é essencial para a transformação celular.

Interação MT/PI3K: A expressão do antígeno MT é capaz de alterar o metabolismo de fosfolípidos, levando a um aumento dos derivados de fosfatidilinositol fosforilados na posição 3 do anel de inositol, pela ativação de PI3K (Whitman *et*

al., 1985, Kaplan *et al.*, 1986, 1987, Ulug *et al.*, 1990). A ligação da subunidade regulatória de PI3K (p85) a MT e sua ativação através de fosforilação, depende da presença do resíduo Tyr-315 fosforilado na molécula de MT. Mutantes de MT que não apresentam este resíduo de tirosina, são defectivos para transformação. Entretanto, outros mutantes defectivos para transformação ativam PI3K em níveis comparáveis a MT selvagem (Druker *et al.*, 1990, Oliveira, 1997, Oliveira *et al.*, 1998).

Interação MT/Shc: Shc possui a habilidade de interagir com proteínas fosforiladas em tirosinas na sequência XNPXY através de seu domínio PTB (domínio de ligação a fosfotirosinas)

O domínio NPTY de MT, o qual compreende o resíduo Tyr-250, é requerido para a interação entre MT e a proteína adaptadora Shc (Campbell *et al.*, 1994), resultando na fosforilação de Shc, em resíduos de tirosinas, e sua associação com Grb2/Sos, levando a ativação de Ras. Inicialmente, o domínio SH2 de Shc foi implicado nesta interação (Dilworth *et al.*, 1994), contudo, dados mais recentes sugerem que o domínio PTB de Shc está envolvido na interação MT/Shc (Blaikie *et al.*, 1997).

Blaikie e colaboradores (1997) mostraram que Shc interage com a proteína fosforilada MT, através de seu domínio PTB, estando envolvido nesta interação o resíduo Phe-198 de Shc. Esta interação é essencial para a fosforilação em Tyr de Shc, a qual ocorre predominantemente nos resíduos de Tyr-239 e Tyr-240. A fosforilação nestes resíduos mostrou-se essencial para a interação de Shc à Grb2, levando a transformação celular por MT (Blaikie *et al.*, 1997).

A associação de MT a Shc se mostrou essencial para a transformação celular por MT, já que mutação no resíduo de Tyr-250, que impede esta associação (mutante 250phe), tornou o antígeno MT completamente defectivo para transformação celular, enquanto que a re-introdução do domínio de ligação a Shc (mutante 250pheNPTY) restaura a sua capacidade transformante (Oliveira *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que a ativação de Ras é essencial para a transformação celular por MT. A importância de Ras na transformação celular por MT foi evidenciada por outros tipos de abordagens: a expressão de Krev-1 (produto do gene *krev-1*, isolado pela capacidade de reverter fibroblastos

transformados por Ras (Noda *et al.*, 1989)), leva à reversão da transformação de fibroblastos em cultura, induzida por MT (Jelinek & Hassel, 1992).

Outro indício do envolvimento de Shc na ativação da via de Ras por MT, é a fosforilação e translocação nuclear de Erk-1 em células que expressam o antígeno MT selvagem, mas não em células que expressam mutantes defectivos para ligação a Shc (Urich *et al.*, 1995, Oliveira *et al.*, 1998).

A associação de MT à PI3K também parece ser necessária para um aumento na atividade de Erk-1, já que alguns mutantes de MT defectivos para a ligação a PI3K apresentam níveis baixos de fosforilação por Erk-1 (Oliveira *et al.*, 1998). O papel de PI3K na ativação de Erks tem sido descrito também por outros grupos, como por exemplo na translocação de Erk-1 para o núcleo (Urich *et al.*, 1995). Uma interrelação das vias de Ras e PI3K é clara (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1995, Campbell *et al.*, 1998), entretanto, os resultados parecem variar de acordo com o tipo celular estudado.

Interação MT/PP2A: O antígeno MT forma complexos estáveis com as subunidades catalítica (C) de 36kDa e regulatória (A) de 63kDa da proteína serina/treonina fosfatase PP2A (PP2A), sendo que a região N-terminal de MT é necessária para essa interação (Campbell *et al.*, 1995, Pallas *et al.*, 1990). A interação com PP2A é essencial, mas não suficiente, para a competência transformante de MT.

Mutantes da subunidade catalítica (C) da proteína fosfatase PP2A, cataliticamente inativos, são capazes de formar complexos eficientemente com o antígeno MT do vírus polioma, sendo ainda capazes de promover a associação e ativação de Src, PI3K e Shc, demonstrando que a atividade de PP2A não é essencial para a formação do complexo MT funcional (Ogris *et al.*, 1999). Tem sido sugerido que um possível papel para a interação MT/PP2A seja a correta localização do complexo MT na membrana celular (Brewster *et al.*, 1997).

Interação MT/PLC- γ : Linhagens celulares transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma apresentam um nível elevado de segundos mensageiros IP₃, produto da quebra de fosfolipídeos de membrana, catalisada pela enzima Fosfolipase C- γ (PLC- γ). Diacilglicerol (DAG) é outro produto gerado pela ação de

PLC- γ . Linhagens celulares transformadas pelo antígeno MT também apresentam atividade constitutiva de PKC (Marcellus *et al.*, 1991). A associação de MT a PLC- γ foi mapeada no resíduo Tyr-322 de MT. Esta associação promove a fosforilação de PLC- γ , levando à sua ativação. A ativação de PLC- γ é necessária para proporcionar o aumento de IP₃ e ativação de PKC observados nas linhagens que expressam o antígeno MT (Su *et al.*, 1995). Mutações na proteína MT que impedem a sua associação à PLC- γ levam a uma proteína MT defectiva para a transformação (Oliveira *et al.*, 1998).

Interação MT/14-3-3: Foi descrita a associação de MT aos membros da família de proteínas 14-3-3, cujos homólogos, em leveduras, foram implicados com a regulação da mitose (Pallas *et al.*, 1994). A associação das proteínas 14-3-3 com a proteína MT ocorre através do resíduo Ser-257 fosforilado de MT (Culleré *et al.*, 1998), sendo essa associação independente da ativação de Src (Pallas *et al.*, 1994). A associação MT/14-3-3 influencia os tipos de tumores induzidos em animais, tendo, porém, pouco efeito na transformação de células em cultura (Culleré *et al.*, 1998).

A região da proteína MT envolvida na interação com as proteínas 14-3-3 parece estar envolvida também com a formação de complexos multiméricos de MT. Mutantes de MT incapazes de se associar com as proteínas 14-3-3 são incapazes de dimerizar, mantendo, porém, a capacidade de transformar células com alta eficiência (Senften *et al.*, 1997).

1.5.3.2) A oncoproteína MT mimetiza PDGF

Células transformadas são capazes de crescer em meio livre de fatores de crescimento. Esta característica é devida, provavelmente, à expressão alterada, inativação ou ativação constitutiva de uma ou mais proteínas importantes na via mitogênica (Rameh & Armelin, 1991; Sonobe *et al.*, 1991).

Linhagens celulares transfectadas com o cDNA correspondente a MT são capazes de crescer em meio livre de PDGF (Armelin *et al.*, 1985) sugerindo que o antígeno MT está, de alguma forma, suprimindo a falta de PDGF.

Existe um grande número de elementos em comum entre a resposta celular a PDGF e ao antígeno MT do vírus polioma (Fig. 11) (Kaplan *et al.*, 1987).

- a) PDGF e MT estimulam a atividade de tirosina quinase de proteínas da família Src.
- b) Ambos induzem a fosforilação de proteínas celulares, incluindo Src.
- c) Assim como PDGF, MT é capaz de alterar os níveis de derivados de fosfatidilinositol fosforilados na posição 3 da cadeia de inositol, por ativação da PI3K (Kaplan *et al.*, 1986).
- d) A infecção pelo vírus polioma leva à um acúmulo dos transcritos correspondentes aos genes de resposta primária a PDGF, *c-fos*, *c-jun* e *c-myc* (Zullo *et al.*, 1987; Glenn & Eckhart, 1990).
- e) Linhagens celulares onde a expressão de MT é regulada pela presença de glicocorticóide no meio, apresentam aumento nos níveis do mRNA correspondente ao proto-oncogene *c-myc* após a indução de MT (Rameh & Armelin, 1991).
- f) Expressão de MT leva à um aumento na atividade de ligação ao DNA do complexo de transcrição AP-1 (Rameh & Armelin, 1992).

Assim, através da modulação da atividade de diversas proteínas celulares, o antígeno MT é capaz de gerar um descontrole na via de transdução de sinal de PDGF, levando à transformação celular.

O estudo dos mecanismos de transformação celular induzidos por MT tem contribuído, ao longo dos últimos anos, para o entendimento do controle normal do ciclo celular.

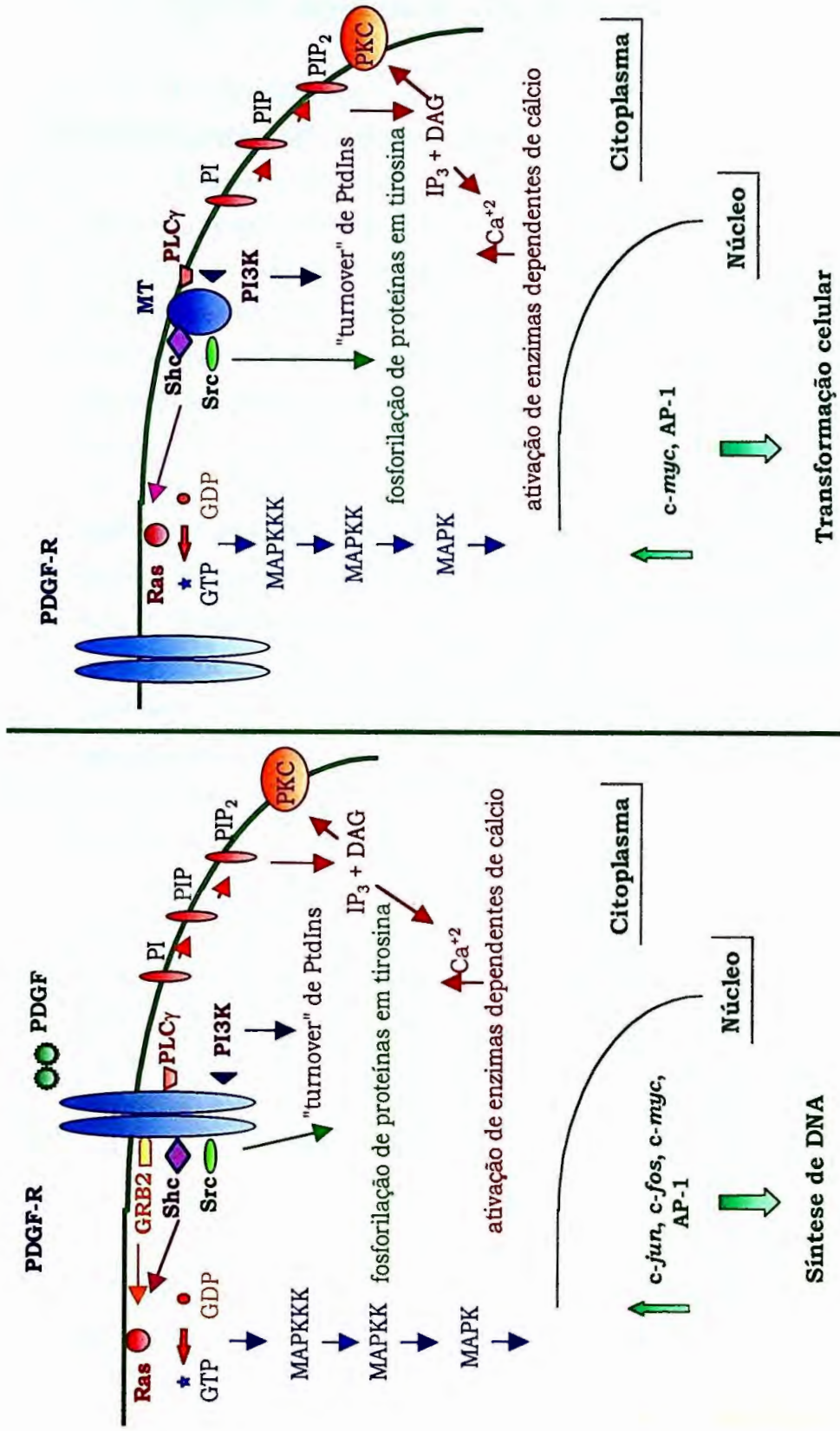


Fig. 11: Comparação entre o sinal mitogênico desencadeado por PDGF e pelo antígeno MT do vírus polioma. Através da ligação ao receptor, PDGF estimula a atividade de várias enzimas citoplasmáticas. O sinal, passado para o núcleo, leva a transcrição de diversos genes cujos produtos são essenciais para a síntese de DNA e divisão celular (painel esquerdo). O antígeno MT do vírus polioma associa-se a várias proteínas importantes na transdução do sinal mitogênico, tornando-as constitutivamente ativas. Como resultado, ocorre um acúmulo de transcritos correspondentes a genes importantes na regulação do ciclo celular, como *c-myc*, além de ativação do complexo de transcrição AP-1. A super-expressão do antígeno MT do vírus polioma induz a transformação celular (painel direito).

1.5.3.3) Ativação do complexo de transcrição AP-1 por MT

A expressão do antígeno MT promove a ativação constitutiva do complexo de transcrição AP-1 (Rameh & Armelin, 1992, Oliveira *et al.*, 1998).

A análise de linhagens celulares que expressam mutantes de MT defectivos para a associação de MT às diversas proteínas celulares, além do uso de inibidores específicos para determinadas vias de transdução de sinal, permitiu a determinação do domínio de MT necessário para a ativação do complexo de transcrição AP-1. Foi verificado que a associação de MT à subunidade regulatória da enzima PI3K é essencial para a ativação constitutiva de AP-1 (Oliveira *et al.*, 1998).

Além disso, a análise dos componentes de AP-1, por introdução de antisoros específicos em ensaios de EMSA, mostrou que as proteínas cFos e FosB não fazem parte do complexo de transcrição AP-1 constitutivamente ativo por MT, sendo detectadas, apenas, proteínas da família Jun: cJun e JunB (Oliveira *et al.*, 1998). Entretanto, ainda não foram analisadas as proteínas Fra-1, Fra-2 e JunD, não sendo possível, portanto, descartar estes dois membros da família Fos como possíveis componentes deste complexo de transcrição ativado por MT.

Além de um aumento na expressão da proteína cJun, modificações pós-traducionais (essencialmente fosforilação dos resíduos de Ser-63 e Ser-73, presentes no domínio de transativação e desfosforilação dos resíduos de Ser-243, Ser-249 e Thr-231, presentes no domínio de ligação ao DNA) constituem outra forma de regulação da atividade transcricional desta proteína. Alterações no padrão de fosforilação de cJun foram descritas em linhagens celulares que expressam Ras ativado ou o antígeno MT do vírus polioma (Binétruy *et al.*, 1991; Srinivas *et al.*, 1994). Deste modo, uma expressão basal associada a eventos pós-traducionais pode levar à indução da capacidade de ligação ao DNA das proteínas Jun.

O uso de linhagens celulares onde a expressão de MT é regulada pela presença de glicocorticóides no meio de cultura, mostrou que a indução da expressão de MT não leva a um aumento nos níveis dos mRNAs de *c-fos* e *c-jun*, apesar de induzir a atividade de AP-1 (Rameh & Armelin, 1991 e 1992). Estes resultados sugerem que outros mecanismos de regulação estão envolvidos.

O complexo de transcrição AP-1 mostrou-se um alvo de MT, porém a ativação deste complexo não é suficiente para conferir um fenótipo transformado, já que mutantes de MT defectivos para a transformação mostraram atividade de AP-1 constitutivamente elevada, similares a linhagem MT selvagem (Oliveira *et al.*, 1998). Este efeito depende, portanto, de outros eventos ainda não determinados.

A via de transdução de sinal de Ras está relacionada com a indução da expressão dos genes das famílias *fos* e *jun*, (Sistonen *et al.*, 1989, Campbell *et al.*, 1998) e com as modificações pós-traducionais dos seus produtos protéicos (Binétruy *et al.*, 1991). Porém, a análise de linhagens celulares que expressam mutantes de MT defectivos para a associação à Shc (e conseqüentemente, defectivos para a ativação de Ras) mostraram atividade de ligação de AP-1 ao DNA, por ensaios de EMSA (ensaio de mobilidade eletroforética), similares à linhagem que expressa a proteína MT selvagem (Oliveira *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que a ativação de AP-1 mediada por MT não é o resultado apenas da ativação de Erks, podendo estar envolvidas outras quinases. A fosforilação das proteínas Jun nos resíduos de Ser-63 e Ser-73 ocorre, principalmente, por ação de JNK e, em menor grau, por ação das Erks (Hibi *et al.*, 1993), podendo assim, a ativação de AP-1, neste modelo, depender da atividade de JNK (Oliveira, 1997).

2) Proposta

Linhagens celulares transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma são capazes de crescer na ausência de PDGF (Armelin et al., 1985), provavelmente, pela sua capacidade de ativar vias de transdução de sinal comuns àquelas desencadeadas pelo sinal mitogênico de PDGF (revisto por Kaplan et al., 1987, Oliveira et al., 1996).

A expressão de MT promove a ativação constitutiva do complexo de transcrição AP-1 (aumento da ligação à sequência consenso AP-1 *in vitro*) em fibroblastos Balb-3T3 (Rameh & Armelin, 1991, 1992). Porém, foi verificado que a sua ativação não é suficiente para conferir um fenótipo transformado, já que alguns mutantes da proteína MT defectivos para a transformação apresentam atividade de AP-1 constitutivamente elevada (Oliveira et al., 1998). Este efeito depende, portanto, de outros eventos ainda não determinados.

Para esclarecer a questão da necessidade de ativação do complexo de transcrição AP-1 na transformação celular mediada pelo antígeno MT do vírus polioma, decidiu-se analisar o efeito do bloqueio da atividade de AP-1, utilizando um mutante dominante-negativo de cJun, nas células que expressam este antígeno tumoral.

A proliferação celular de eucariotos é um processo que depende tanto da ação de proteínas quinases como de proteínas fosfatases (Hunter, 1998). Tem sido descrito o envolvimento de algumas proteínas tirosinas fosfatases (LMW-PTP) no processo de desfosforilação do receptor de PDGF (Berti *et al.*, 1994; Bucciantini *et al.*, 1998).

Como tem sido relatado um grande número de elementos comuns entre a resposta celular a PDGF e ao antígeno MT (Kaplan et al., 1987; Oliveira et al., 1996), decidiu-se analisar o papel da LMW-PTP na transformação celular mediada pelo antígeno MT do vírus polioma.

O projeto tem por objetivo contribuir para o entendimento das bases moleculares da transformação celular mediada pelo antígeno MT do vírus polioma e o melhor entendimento das vias de transdução de sinal desencadeadas pela superexpressão deste antígeno.

3) Materiais e Métodos

3.1) Plasmídeos

pCMV: vetor de expressão de mamífero contendo o promotor de citomegalovírus. Utilizado como controle para os ensaios de transfecção estável.

pCMV-67: vetor derivado do pCMV β (Clontech) onde o gene da β -galactosidase foi substituído pelo cDNA TAM67, o mutante dominante negativo de cJun. O gene de interesse é transcrito sob a ação do promotor de citomegalovírus (Brown *et al.*, 1994).

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

pGL-3-SV40 (Promega, WI, USA): vetor de expressão de luciferase sob o controle do promotor do gene SV40 (vírus de sarcoma de símios). Utilizado como controle interno para normalizar a eficiência de transfecção nos ensaios de transfecção transitória.

pSEAP-AP-1 (Clontech): vetor que contém uma sequência específica de ligação ao DNA cis-ativa, correspondente ao elemento responsivo a AP-1. Este elemento está localizado "upstream" em relação a região promotora "TATA-like" do promotor de timidina quinase do vírus de herpes simplex (HSV-TK), regulando a expressão do gene repórter da fosfatase alcalina secretada (SEAP).

pSEAP-Control (Clontech): vetor que contém o promotor do gene SV40 clonado "upstream" e um elemento "enhancer", também do gene SV40, localizado "downstream" em relação ao gene repórter da fosfatase alcalina secretada (SEAP). Este plasmídeo expressa constitutivamente fosfatase alcalina secretada (SEAP) em muitos tipos celulares, sendo, portanto, uma construção adequada para otimizar os experimentos de transfecção, sendo utilizada como controle positivo dos nossos experimentos.

pSEAP-Basic (Clontech): vetor que contém o gene SEAP sem nenhum promotor ou "enhancer". Este plasmídeo funciona como controle negativo dos experimentos.

pX343: contém o gene bacteriano que codifica para resistência a higromicina B sob controle do LTR de Mo-MuSV e clonado em pBR322 (Costanzi *et al.*, 1990).

pUC18-PTP: pUC18 contendo o cDNA humano correspondente à proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP).

3.2) Linhagens Celulares

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

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

PLJ: A31 infectada com o vetor retroviral PLJ, que contém um marcador de resistência à geneticina (G418).

clones MTC: MTWT transfectada com o vetor de expressão pCMV vazio.

clones MTJ: MTWT transfectada com o vetor pCMV-67 que expressa o dominante negativo de cJun.

3.3) Materiais utilizados para cultura de células de mamífero

Meio de cultura: DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") (Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA).

Soro Fetal Bovino: FCS (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo).

Solução Salina: PBSA ("Phosphate Buffered Saline"), solução salina tamponada pH 7,2 composta por 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 8mM Na₂PO₄ e 1,4mM KH₂PO₄.

Tripsina: ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland USA; Gibco Limited, Scotland, UK.

Higromicina B: Sigma, St. Louis, USA.

3.4) Meio de cultura para bactérias

LB: Meio de Luria-Bertani para cultivo bacteriano, composto por 10g/L de triptona; 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl, pH 7,5. Para o preparo de meio sólido em placas, adicionou-se 15g/L de ágar (Difco, Merk, Gibco-BRL).

3.5) Soluções.

Todas as soluções utilizadas são feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, seguindo formulações descritas em manuais de laboratório (Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989).

3.6) Preparo de bactérias competentes utilizando CaCl₂ e transformação de *Escherichia coli* com DNA plasmideal

Uma colônia da bactéria XL1-Blue é inoculada em 40mL de meio LB e cultivada sob agitação a 37°C até uma densidade óptica a 600nm de 0,5 (OD₆₀₀=0,5). A suspensão de bactérias é resfriada em gelo por 10min e centrifugada a 1500g por 7min a 4°C. Descarta-se o sobrenadante e o sedimento de bactérias é ressuspensão em 10mL de uma solução contendo 60mM CaCl₂ (pré resfriada em gelo). Centrifuga-se a suspensão a 1500g por 5min a 4°C, descarta-se o sobrenadante e o sedimento de bactérias é ressuspensão em 2mL da solução de 60mM CaCl₂ contendo 15% de glicerol. A suspensão é aliqüotada e estocada a -70°C. Um tubo contendo 50µL da bactéria competente (estocada a -70°C) é descongelado rapidamente e mantido em gelo. Adiciona-se o plasmídeo a ser amplificado (100ng) e mantém-se o tubo no gelo por 30min. O tubo é aquecido a 42°C por 1min e rapidamente transferido para o gelo, onde se mantém por, pelo menos, 1min. A mistura é transferida para 1,0mL de meio de cultura LB e incubada a 37°C por 1h com agitação moderada. Diferentes diluições da cultura bacteriana são semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (1,5% ágar) contendo o antibiótico adequado (ampicilina: 70µg/mL).

3.7) Preparação de DNA plasmideal em média escala

Para a preparação de DNA plasmideal, utilizou-se o kit da QIAGEN (QIAfilter plasmid mid). Uma colônia de bactéria transformada com o DNA plasmideal é inoculada em 50mL de meio LB contendo o antibiótico adequado (ampicilina: 70µg/mL). Cultiva-se a 37°C com agitação “overnight”. Centrifuga-se esta cultura a 6000g por 15min e descarta-se o sobrenadante. Ressuspende-se o sedimento de bactérias em 4mL de tampão P1 (100µg/mL RNase A; 50mM TrisCl; 10mM EDTA; pH8,0). Em seguida, adiciona-se 4mL do tampão de lise P2 (200mM NaOH; 1%SDS), mistura-se suavemente e incuba-se a temperatura ambiente por 5min. Adiciona-se o tampão de neutralização P3 (3,0M KAc; pH5,5), mistura-se rapidamente, porém com cuidado para não ocorrer quebra do DNA genômico. O precipitado de proteínas e DNA genômico é, então, eliminado através de filtração utilizando os QIAfiltros. O lisado límpido é aplicado a uma coluna contendo uma resina à qual se liga o DNA plasmideal. Essa coluna é pré-equilibrada com 4mL de tampão QBT (750mM NaCl; 50mM MOPS; 15% etanol; 0,15% Triton X-100; pH7,0). Após a passagem do lisado pela coluna, lava-se a coluna duas vezes com 10mL do tampão QC (1,0M NaCl; 50mM MOPS; 15% etanol; pH7,0). O DNA plasmideal é eluído da coluna com 5mL do tampão QF (1,25M NaCl; 50mM TrisCl; 15% etanol; pH8,5). Precipita-se o DNA com 3,5mL de isopropanol a temperatura ambiente. Centrifuga-se imediatamente a 30.000g por 30min, a 4°C, e remove-se o sobrenadante cuidadosamente. Lava-se o precipitado de DNA com 2mL de 70% etanol e centrifuga-se a 30.000g por mais 10min. Remove-se o sobrenadante, seca-se o precipitado de DNA a temperatura ambiente por uns 5 min e dissolve-se em um volume apropriado de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA). O DNA plasmideal é quantificado por espectrofotometria e analisado através de digestão com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel 1% agarose em 1X TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA, pH7,5) contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo.

3.8) Cultura de células

As linhagens celulares são cultivadas em frascos plásticos descartáveis, contendo meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementados com 1,2g/L de bicarbonato de sódio, 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina, contendo 10% de soro fetal bovino. O pH e a temperatura são mantidos na faixa fisiológica através de incubação em estufa a 37°C, com atmosfera de 2% de CO₂. Estoques celulares são congelados em 10% DMSO (dimetilsulfóxido) e mantidos a -190°C em reservatório contendo nitrogênio líquido. O meio de cultura é renovado a cada três dias. A cultura é subdividida quando as células atingem uma densidade equivalente a 80% da densidade de saturação.

3.9) Transfecção de células de mamíferos com DNA plasmideal.

As linhagens celulares são plaqueadas em placas de Petri com 60mm de diâmetro e mantidas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (FCS) "overnight" a 37°C em atmosfera de 2% CO₂ de forma a atingirem aproximadamente 50-80% da confluência na hora da transfecção. Utiliza-se o kit LipofectAMINE PLUS Reagent (Gibco-BRL). 5µg dos DNAs plasmideais de interesse (pCMV ou pCMV-67) e 0,5µg do DNA plasmideal que confere resistência seletiva (Higromicina-p343X) são misturados a 8µL do reagente PLUS, juntamente com 250µL de DMEM sem soro e incubados por 15 min a temperatura ambiente para a formação do pré-complexo. Depois adiciona-se 12µL reagente LipofectAMINE, mistura-se e incuba-se a temperatura ambiente por mais 15min. Após lavagens das culturas com PBSA e meio DMEM sem soro, mantém-se as culturas com o meio DMEM sem soro e adiciona-se a mistura DNAs-PLUS-LipofectAMINE. Incuba-se a 37°C em atmosfera de 2% CO₂ por 3-6 horas. Adiciona-se então soro fetal bovino (FCS) às culturas de modo a atingirem a concentração final de 10%. Após 48h as culturas são divididas e mantidas em meio seletivo, contendo o antibiótico adequado (higromicina: 100µg/mL). As colônias obtidas são separadas por tripsinização, com o auxílio de anéis de clonagem (ver item 3.10).

3.10) Isolamento dos clones celulares.

As placas contendo as colônias resistentes a Higromicina são lavadas 1X em PBS. Após a remoção do PBS, anéis de clonagem são colocados em volta das colônias de forma a separá-las do resto da placa. Uma solução de tripsina é adicionada sobre a colônia circundada pelo anel e as células são coletadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. As células correspondentes a cada colônia (clone) são transferidas para uma placa de 35mm e mantidas em meio seletivo. Os clones resistentes são expandidos para posterior análise.

3.11) Transfecção transitória e ensaios de gene repórter.

As linhagens celulares são plaqueadas em placas de 12 poços (22mm de diâmetro), aproximadamente $3,0 \times 10^4$ cél/ poço, um dia antes da transfecção. Os vetores plasmidiais, purificados pelo kit da QIAGEN (QIAfilter plasmid mid - item 3.6), são transfectados utilizando LipofectAMINA PLUS. Passadas 24hs da transfecção, o meio de cultura é renovado, e após 24hs adicionais, o sobrenadante e as células são coletados e a expressão do gene repórter fosfatase alcalina secretada e luciferase são analisados utilizando o sistema Clontech (Great EscApe™ SEAP Reporter System 3) e Promega (Luciferase Assay System). As medidas de expressão dos diferentes genes repórteres, nas diferentes amostras, são realizadas todas no mesmo dia utilizando um aparelho luminômetro (EG & G Berthold, Microplate Luminometer LB 96V).

Método utilizando LipofectAMINE PLUS: os DNAs plasmidiais de interesse: 1 μ g do plasmídeo pSEAP-AP-1 (ou o controle positivo pSEAP2-Control) e 0,25 μ g do plasmídeo pGL3-SV40, são misturados a 4 μ L do reagente PLUS, juntamente com 250 μ L de DMEM sem soro e incubados por 15 min a temperatura ambiente para a formação do pré-complexo. Adiciona-se 6 μ L do reagente LipofectAMINE, mistura-se e incuba-se a temperatura ambiente por mais 15 min. Após lavagens das culturas com PBSA e meio DMEM sem soro, mantém-se as culturas com o meio DMEM sem soro e adiciona-se a mistura DNAs-PLUS-LipofectAMINE.

Incuba-se a 37°C em atmosfera de 2% CO₂ por 3-6 horas. Adiciona-se então soro fetal bovino (FCS) às culturas de modo a atingirem a concentração final de 10%.

Medida da atividade de fosfatase: 24h após a transfecção, as células são lavadas com PBSA e o meio de cultura é renovado. Após 24h adicionais, 110µL do sobrenadante são coletados. Centrifuga-se à 12000g por 10s. Transfere-se 100µL do sobrenadante para um tubo limpo; nesta etapa a amostra pode ser estocada à -20°C por até 1 mês. Utilizou-se o kit Great EscApe™ SEAP Reporter System 3. Adiciona-se 75µL do tampão de diluição à 25µL da amostra e incuba-se a 65°C por 30min. As amostras são resfriadas em gelo por 2-3 min. Adiciona-se 100µL do tampão de amostra e incuba-se por 5min. Adiciona-se 100µL do substrato diluído (1,25mM substrato CSPD-diluído no tampão de quimioluminescência) e incuba-se de 10-60 min a temperatura ambiente e imediatamente mede-se a intensidade de luz emitida durante 10s, utilizando-se um aparelho luminômetro (EG & G Berthold, Microplate Luminometer LB 96V).

Medida da atividade de luciferase: 24h após a transfecção, as células são lavadas com PBSA e o meio de cultura é renovado. Após 24h adicionais, as células são lavadas duas vezes com PBSA, incubadas por 30min sob agitação, à temperatura ambiente, com 1X “Passive Lysis Buffer” (Promega) e coletadas (este lisado pode ser estocado a -20°C por, no máximo, 1 mês). A expressão do gene repórter luciferase é analisada utilizando o kit “Luciferase Assay System” (Promega) e o aparelho luminômetro (EG & G Berthold, Microplate Luminometer LB 96V). Para medir a atividade de luciferase, adiciona-se 100µL da Luciferase assay reagent (LAR) a 20µL do lisado celular e imediatamente mede-se a intensidade de luz emitida durante 10s. As atividades de luciferase foram utilizadas para a normalização da eficiência de transfecção obtida em cada experimento.

3.12) Preparação de mRNAs.

Utiliza-se o kit Quick prep mRNA purification (Amersham Pharmacia Biotech). Células cultivadas em placas de Petri com 150mm de diâmetro são tripsinizadas após atingirem a sub-confluência. Inativa-se a tripsina com meio contendo soro e centrifuga-se o suficiente para sedimentar as células. Remove-se o meio, lava-se as células com PBSA e centrifuga-se novamente. Após repetir esta lavagem, o “pellet” de células é estocado a -80°C ou é imediatamente lisado com 0,4mL do tampão de extração do kit (solução aquosa tamponada contendo tiocianato de guanidina e N-lauroil sarcosina). Após a lise total e obtenção de uma suspensão homogênea, adiciona-se 0,8mL do tampão de eluição (10mM TrisCl pH 7,5; 1mM EDTA) para se obter uma concentração salina ideal para a ligação do mRNA à resina de oligo dT. Após a centrifugação para a obtenção de um homogenato celular límpido, adiciona-se este homogenato à resina de oligo dT (previamente preparada centrifugando-se 1mL da suspensão de oligo dT e removendo-se o sobrenadante). A suspensão do homogenato celular e oligo dT é suavemente misturada, invertendo o tubo, por 3 min. Centrifuga-se a 16000g por 10s e remove-se o sobrenadante. Adiciona-se 1mL do Tampão de alta concentração salina (10mM TrisCl pH 7,5; 1mM EDTA; 0,5M NaCl), ressuspende-se a resina e centrifuga-se a 16000g por 10s. Remove-se o sobrenadante e repete-se esta lavagem mais 4 vezes. Depois repete-se a lavagem mais 2 vezes utilizando o Tampão de baixa concentração salina (10mM TrisCl pH 7,5; 1mM EDTA; 0,1M NaCl). Após estas séries de lavagens, ressuspende-se a resina em 0,3mL de Tampão de baixa concentração salina e transfere-se a suspensão para a coluna “micro spin”. Essa coluna é colocada sob um tubo “eppendorf” para se descartar as soluções de lavagem. Centrifuga-se a coluna junto com o tubo “eppendorf” e depois descarta-se o efluente. Adiciona-se 0,5mL da solução de baixa concentração salina à coluna e centrifuga-se novamente descartando-se o efluente. Repete-se essa lavagem mais 2 vezes. A coluna é transferida para um tubo “eppendorf” estéril, que servirá para a coleta do eluato. Adiciona-se à coluna 0,2mL da solução de eluição pré-aquecida a 65°C e ressuspende-se a resina antes da centrifugação. Repete-se o procedimento com mais 0,2mL da

solução de eluição. Obtém-se 0,4mL do eluato. O mRNA é precipitado com a adição de 10 μ L da solução de glicogênio (5-10mg/mL), 40 μ L da solução de 2,5M acetato de potássio e 1mL de etanol absoluto. Mistura-se e deixa-se precipitando “overnight” a -70°C. Centrifuga-se a 4°C por 20 min e descarta-se o sobrenadante. O “pellet” de mRNA é redissolvido em um volume adequado de água (10 μ L). Após a quantificação espectrofotométrica, a sua qualidade pode ser visualizada em gel de agarose-formaldeído (Sambrook et al., 1989).

3.13) Ensaios de Northern-blot.

A) Fracionamento de RNA em gel de agarose-formaldeído e transferência para membrana de nylon: Aliquotas de 2 μ g de mRNA, obtidas no item anterior, são tratadas, por 10min a 65°C, em solução 18% formaldeído, 50% formamida e 1X tampão MOPS, contendo brometo de etídeo e, logo em seguida são colocadas em gelo para manter a linearização das moléculas de RNA. Após a adição do tampão de amostra 5X concentrado (50% glicerol; 0,125% Azul de bromofenol; 0,125% xileno cianol) para volume final 1X, o RNA é fracionado em gel 1,2% agarose-formaldeído, em tampão 1X MOPS, sob voltagem constante (80Volts). Após a corrida, o gel é irradiado com luz ultravioleta para análise da qualidade do RNA. O gel é lavado 3 vezes (10min cada) com água para a remoção do excesso de formaldeído. O RNA fracionado é transferido, por capilaridade, para membranas de nylon, em 10X SSC por, mais ou menos, 15h. Após a transferência, as membranas foram lavadas em 6X SSC e assadas a 80°C, por 2h para fixação dos RNAs na membrana.

B) Preparo da sonda de DNA radioativa: Para a marcação da sonda radioativa utiliza-se [α -³²P] dCTP e o kit “Ready to Go” (Amersham Pharmacia Biotech), baseado na reação de “Random Primer Extension” (Feinberg & Vogelstein, 1984). Adiciona-se 20 μ L de água à mistura de reação (uma solução liofilizada contendo dATP, dGTP e dTTP, 4-8 unidades da enzima Klenow) e coloca-se em gelo por 5-60min. A solução contendo 25-50ng do fragmento de DNA (25 μ L) é fervida por 5min para desnaturação, imediatamente resfriada em gelo. Em seguida, esta solução de DNA (25 μ L) é adicionada à mistura de reação reconstituída em água

(20 μ L) juntamente com 5 μ L (50 μ Ci) de [α -³²P] dCTP (3000 μ Ci/mmol). Mistura-se gentilmente e incuba-se a reação a 37°C por 30min. As sondas radioativas são separadas dos nucleotídeos livres em colunas de Sephacryl S-300 HR (Amersham Pharmacia Biotech) e desnaturadas em água fervente por 5min antes de serem utilizadas para a hibridização. A sonda correspondente ao dominante negativo de cJun foi preparada a partir do plasmídeo pCMV67. A sonda correspondente ao controle interno 36B4 (fosfoproteína ribossomal ácida humana PO) é preparada a partir de um fragmento de 0,8kb do cDNA de 36B4, obtido por digestão do plasmídeo pGEM36B4cDNA com a enzima de restrição PstI. A sonda correspondente a proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP) foi obtida a partir do plasmídeo pUC18-PTP.

Isótopo radioativo utilizado: [α -³²P] dCTP (3000 μ Ci/mmol), Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Buckinghamshire, England; DuPont New England Nuclear, Boston, MA, USA).

C) Hibridização e lavagem dos filtros: As membranas são pré-hibridizadas a 42°C por, no mínimo, 2h e a seguir, hibridizadas a 42°C por 24h, em 5X SSPE, 50% formamida, 5X solução de Denhardt, 0,1% SDS, 100 μ g/mL de DNA de esperma de salmão (desnaturado) e a sonda marcada com α [³²P]dCTP (pelo menos 5,0x10⁵ cpm/mL) desnaturada. Após a hibridização, as membranas são lavadas duas vezes em 2X SSC e 0,1% SDS a temperatura ambiente por 30min e 4 vezes em 0,2X SSC e 0,1% SDS a 56°C por 30min. As membranas são expostas a filmes de raio X (X-omat K) e reveladas após a exposição a -70°C ou utiliza-se o sistema de analisador de imagens Storm para a detecção das bandas. A quantidade de RNA em cada amostra é controlada através da hibridização das mesmas membranas com sonda da fosfoproteína ribossomal ácida humana PO (36B4).

3.14) Curvas de crescimento

Cada linhagem celular é plaqueada em placas de Petri descartáveis de 35mm (5,0 x 10⁴ células) e as culturas são mantidas à 37°C em atmosfera de 2% CO₂. O meio de cultura, DMEM-0,5% FCS ou DMEM-10% FCS é renovado a cada três

dias. A cada dois dias, triplicatas de cultura de cada linhagem celular são coletadas através de tripsinização e fixadas em solução 3,7% formaldeído-PBSA. A contagem das suspensões de células é realizada com o auxílio de um contador eletrônico modelo CC530 (CELM-Companhia de Equipadora de Laboratórios Modernos).

3.15) Crescimento em suspensão de agarose.

São utilizadas soluções de 1,2% e 0,6% agarose, 2X DMEM e FCS. A agarose é fundida e mantida em banho a 45°C. São misturados o 2X DMEM, o soro e a agarose 1,2%, de modo a obter a chamada agarose dura (0,6% agarose em DMEM-10%FCS). Essa solução é despejada em bandejas de 24 poços (0,5mL por poço). É feita uma suspensão de células de modo a se obter células bem isoladas para garantir que cada colônia se origine a partir de uma única célula. Faz-se diluições seriadas desta suspensão de células e distribui-se (em duplicatas) nos poços contendo agarose dura. Rapidamente a agarose semi-sólida (0,3% agarose em DMEM-10%FCS) é preparada e colocada por cima das células. Depois de completa a geleificação, a bandeja é incubada em câmara úmida, 2% CO₂ a 37°C. No dia seguinte adiciona-se 0,5mL de meio de cultura líquido DMEM-10%FCS em cada poço. O meio de cultura líquido é renovado a cada três dias e ao final de duas semanas as colônias são analisadas com o auxílio de um microscópio Nikon Diaphot, invertido, com contraste de fase.

3.16) Extração da proteína citoplasmática - LMW-PTP.

As células cultivadas em placas P150 são lavadas 2X com PBSA gelado, coletadas com o auxílio de um "policia", colocadas em tubos cônicos e centrifugadas 1500rpm por 5min. O "pellet" de células é ressuspense em 1 ml de tampão hipotônico (10mM Hepes, pH 7,9; 10mM KCl; 0,1mM EDTA; 0,1mM EGTA; 2 µg/ml aprotinina; 2µg/ml leupeptina) e transferido para um "eppendorf". A solução é deixada no gelo por 10 min. Adiciona-se NP40 (final 0,1%) e agita-se a solução vigorosamente por 30s. Em seguida, centrifuga-se à 16000g por 30s. O sobrenadante é coletado (fração citoplasmática) e utilizado imediatamente para as dosagens da atividade fosfatásica. O conteúdo protéico (mg/ml) é determinado

pelo sistema da Bio-Rad (método de Bradford). A curva padrão é realizada utilizando concentrações variadas de BSA (albumina de soro bovino).

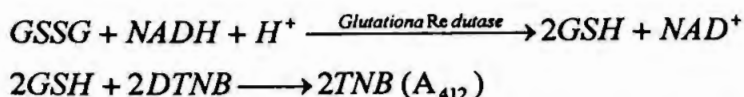
3.17) Determinação da atividade enzimática da LMW-PTP.

A atividade enzimática é determinada como descrito por Granjeiro *et al.*, 1997. Resumidamente, para um volume final de 0,5 mL, a reação é iniciada pela adição de 0,05mL do extrato protéico a um meio contendo 100mM de tampão acetato de sódio - pH 5,0 e 5mM do substrato pNPP (p-nitrofenil fosfato) na presença de 10mM de NaF e tartarato (inibidores de fosfatase ácida não específica, sendo a atividade residual decorrente da LMW-PTP). Incuba-se por 20 minutos a 37°C. A paralisação da reação ocorre pela adição de 0,5mL de 1,0M NaOH. A medida da absorção é realizada a 405nm ($\epsilon=18000\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de produto por minuto. A atividade enzimática específica (AE) é expressa como unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (AE=UE/mg).

3.18) Determinação de glutathiona reduzida e glutathiona total.

O estado oxidativo das células é determinado pela razão GSH/(GSH+2GSSG), de acordo com Murphy e Kehrer (1989). As diferentes células são cultivadas em triplicata, em placas de 150mm e na sub-confluência são coletadas e lisadas como descrito anteriormente. O extrato límpido é utilizado para a quantificação de proteína (Método de Bradford, Bio-Rad).

A) Determinação de GSH+2GSSG: 50 μl da amostra são adicionados ao meio de reação (0,1 M de tampão fosfato pH 8,0, contendo 5mM EDTA, 0,6mM DTNB e 0,1UI de glutathiona redutase). A reação procede segundo o seguinte esquema:



A reação é iniciada pela adição de 0,2mM de NADH. A formação de TNB é acompanhada por 2min a 412nm. A concentração em nmoles de GSH/ml é

determinada através de uma curva padrão utilizando GSH comercial (10 μ M) nas seguintes concentrações: 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 nmoles/ml.

B) Determinação de GSH: 125 μ l da amostra são diluídos 1:1 em 0,1M tampão fosfato, contendo 5mM EDTA. Adiciona-se 250 μ l de 2,0mM DTNB. Incuba-se por 20 min a temperatura ambiente e procede-se à leitura da A₄₁₂. A concentração em nmoles de GSH/ml é determinada através de uma curva padrão utilizando GSH comercial (10 μ M) nas seguintes concentrações: 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 nmoles/ml.

3.19) Análises estatísticas dos dados.

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

Teste de equivalência da variância de populações de dados (Teste F): este teste possibilita a análise da variância dos dados obtidos nas diferentes populações, classificando-as em variâncias equivalentes ou não. Este teste direciona o tipo de Teste T de Student a ser aplicado.

Teste da diferença estatisticamente significativa entre populações de dados (Teste T de Student): este teste possibilita a análise da diferença entre duas populações de dados, classificando-as em significativamente diferentes ou não. Para a realização deste teste é necessário a definição prévia das variâncias dos dados das populações (Teste F).

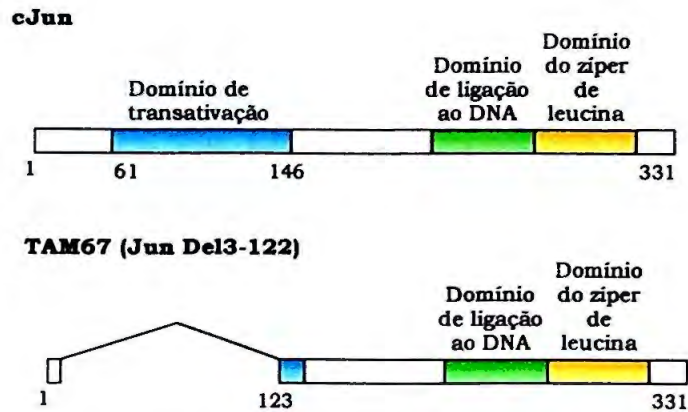
4) Resultados

A transformação celular mediada pelo antígeno MT do vírus polioma envolve a ativação do complexo de transcrição AP-1 (Rameh & Armelin, 1992). Entretanto, esta ativação não é suficiente para a transformação celular induzida por MT, havendo a necessidade de eventos adicionais (Oliveira *et al.*, 1998). Sabendo que as proteínas da família Jun, particularmente cJun e JunB, foram detectadas no complexo de transcrição AP-1 expresso constitutivamente em células que expressam MT, propôs-se a análise do efeito da super-expressão de um dominante negativo de cJun (Brown *et al.*, 1993, 1994) em células transformadas por MT.

Utilizou-se, para este objetivo, uma linhagem celular que foi originada a partir da linhagem Balb-3T3 (clone de A31) e que expressa o gene que codifica para o antígeno MT (linhagem MTWT). Como controle foi gerada a linhagem PLJ, A31 transfectada com o vetor de expressão PLJ vazio (Oliveira *et al.*, 1998).

O mutante dominante negativo de cJun (mutante TAM67) foi construído e cedido pelo laboratório do Dr Michael Birrer (National Cancer Institute). Este mutante não apresenta o domínio de transativação, porém ainda tem a capacidade de formar dímeros com as proteínas Fos e Jun celulares e, desta maneira, bloquear sua ação (Fig. 12).

Estrutura do mutante dominante-negativo de cJun



Mecanismo de inibição do mutante dominante-negativo de cJun

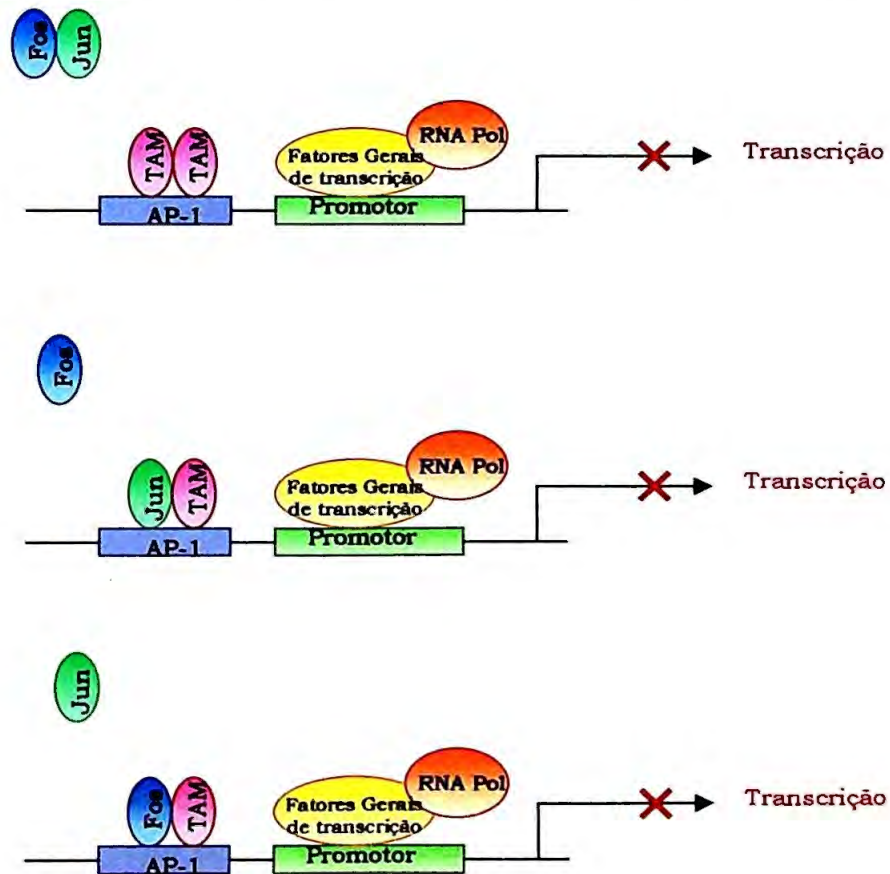


Fig. 12: Estrutura e modo de ação do mutante dominante negativo de cJun. O mutante TAM67 não apresenta o domínio de transativação, porém ainda tem a capacidade de formar dímeros com as proteínas Fos e Jun celulares e, desta maneira, bloquear sua ação.

A clonagem do cDNA do mutante dominante negativo de cJun foi feita em vetor de expressão de mamífero, sob a ação do promotor de citomegalovírus (pCMV) (Brown *et al.*, 1994) (Fig. 13). Como controle das transfecções utilizou-se o vetor pCMV vazio.

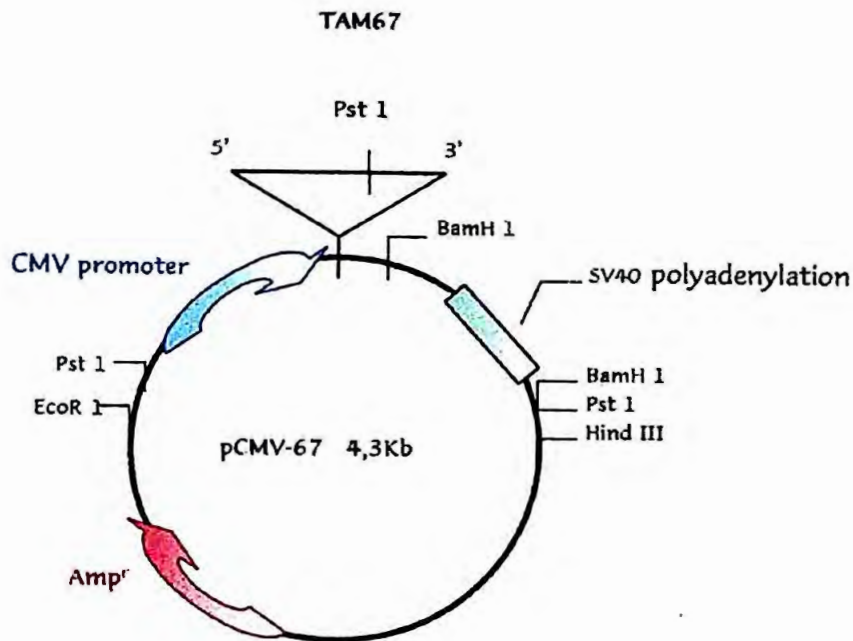


Fig. 13: Representação do vetor pCMV-67. O vetor pCMV-67 é derivado do pCMV β (Clontech), por substituição do gene da β -galactosidase pelo cDNA de TAM67. O gene de interesse é transcrito pela ação do promotor de Citomegalovírus.

Foram realizadas diversas transfecções deste mutante de cJun nas células que expressam MT (linhagem MTWT), obtendo-se diversos clones denominados MTJ. Como controle, foram feitas, em paralelo, transfecções nas células MTWT utilizando somente o vetor pCMV vazio, obtendo-se os clones MTC.

4.1) Análise do efeito morfológico do mutante dominante negativo de cJun em células transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma

Células transformadas apresentam alterações na morfologia e no crescimento que podem ser facilmente analisadas em cultura. Algumas técnicas foram utilizadas para a comparação entre a linhagem MTWT e os diferentes clones obtidos.

A linhagem MTWT possui um crescimento desordenado, com células arredondadas, menos aderentes ao substrato (quando comparadas à linhagem parental de células normais) e que continuam a proliferar mesmo após atingirem a confluência. A morfologia desta linhagem pode ser observada na Fig. 15 (painel direito, em baixo).

A transfecção do mutante dominante negativo de cJun na linhagem MTWT induziu uma mudança morfológica nas células, o que não foi observado nos clones obtidos a partir da transfecção com o vetor pCMV vazio. As figuras 14 e 15 mostram a morfologia destes clones em comparação com a linhagem MTWT e a linhagem PLJ (que não expressa MT), respectivamente nossos padrões de célula transformada e normal.

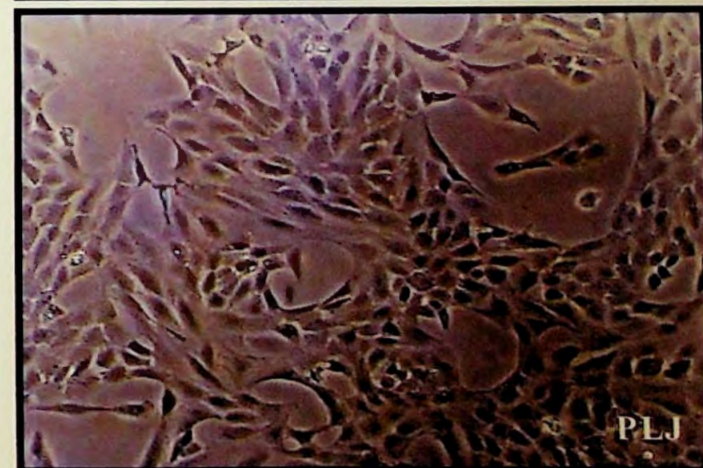
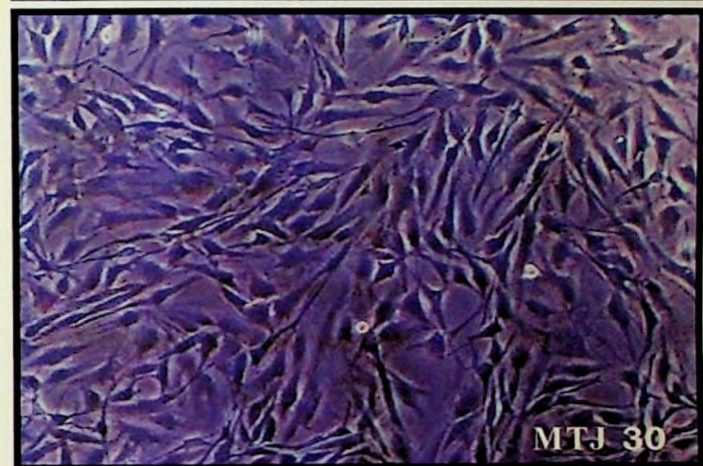
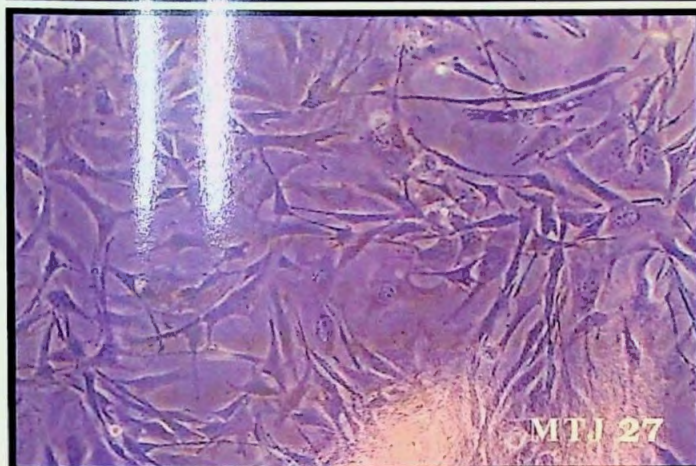
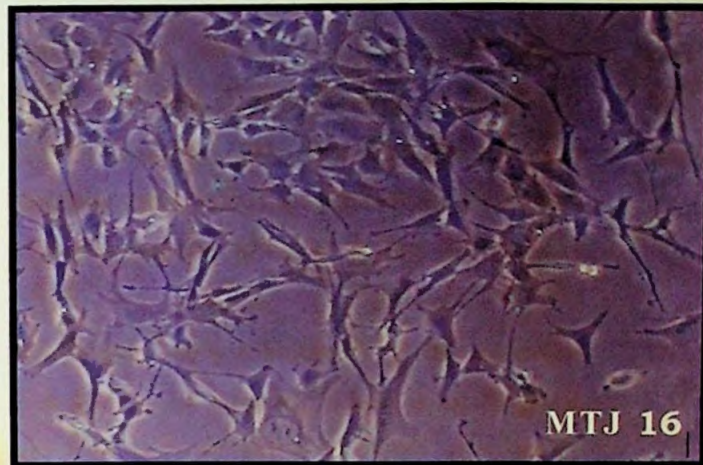
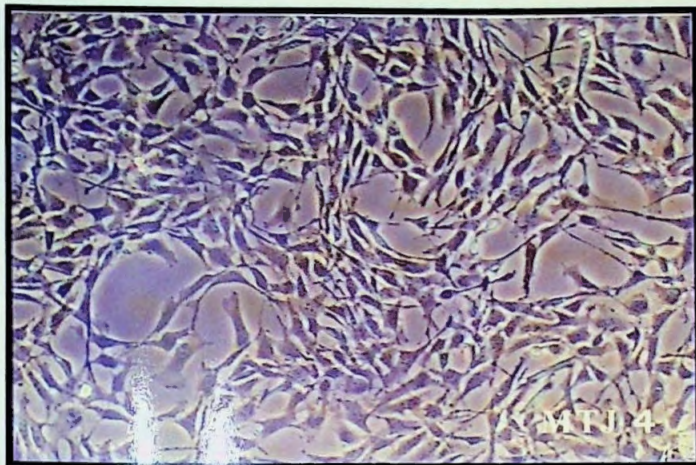


Fig. 14: Morfologia dos clones MTJ. Transfecção da linhagem MTWT com o vetor pCMV-67 proporciona uma drástica mudança morfológica nas células. As células tornam-se achatadas e começam a crescer formando monocamadas. As fotos foram obtidas em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento: 100X).

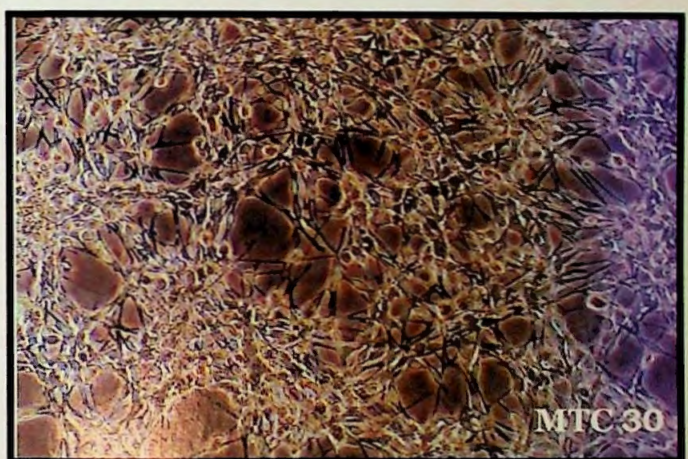
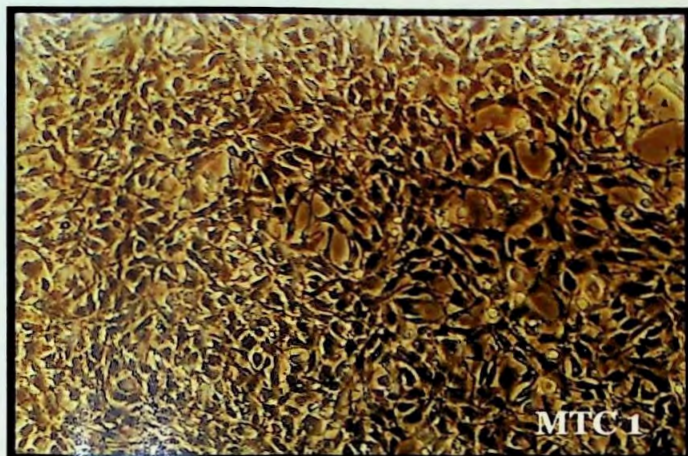


Fig. 15: Morfologia dos clones MTC. Transfecção da linhagem MTWT com o vetor pCMV vazio não proporciona mudança morfológica nas células. Os clones apresentam características de células transformadas com morfologia arredondada, não apresentando inibição do crescimento por densidade. As fotos foram obtidas em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento: 100X).

Observa-se que os clones derivados da transfecção com o vetor pCMV-67, clones MTJ4, MTJ16, MTJ27, MTJ30 e MTJ32 (Fig. 14) possuem semelhanças às células normais por formarem monocamadas em cultura e por serem constituídos de células maiores, tendo características morfológicas equivalentes a fibroblastos normais. A figura 14 mostra a linhagem normal PLJ (painel direito, em baixo) em comparação com os clones MTJs. Por outro lado, os clones derivados da transfecção com o pCMV vazio, clones MTC1, MTC5, MTC29, MTC30 e MTC31 (Fig. 15), possuem uma semelhança com a linhagem MTWT (linhagem transformada) por não formarem monocamadas de células organizadas e serem constituídos de células menores que se empilham facilmente umas nas outras.

4.2) Análise da expressão do mutante dominante-negativo de cJun

A análise da expressão do mutante dominante negativo de cJun nos clones celulares MTJs foi realizada através de ensaios de Northern-blot (Fig. 16). As diferentes linhagens foram cultivadas em meio contendo 10% de soro e coletadas ao atingirem a subconfluência. O mRNA de cada linhagem foi extraído, fracionado em gel de agarose-formaldeído e transferido para a membrana de nylon. Esta membrana foi hibridizada com sonda radioativa correspondente ao gene que codifica para o mutante TAM67 e para o gene de expressão constitutiva da glicoproteína ribossomal ácida (36B4). A figura 16 mostra os resultados obtidos.

Foi detectada uma banda de 2,3kb (tamanho esperado para o transcrito TAM67) nos clones MTJ27, MTJ30 e MTJ32. Uma banda de 3,2kb, correspondente ao transcrito de *c-jun* endógeno, foi observada (na imagem digitalizada) em todas as linhagens celulares, porém a impressão na figura 16 não possibilitou uma adequada visualização destas bandas.

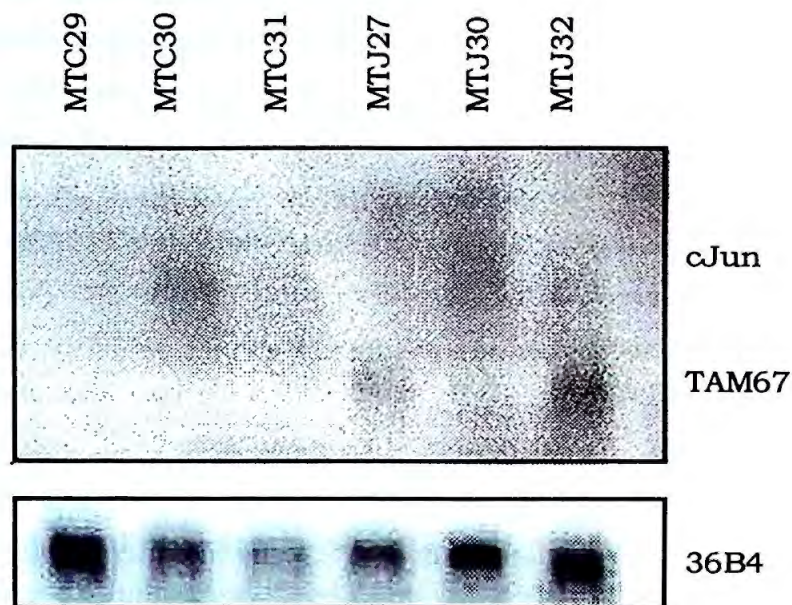


Fig. 16: Expressão do mutante dominante negativo de cJun. Ensaio de Northern-blot utilizando 2 μ g de mRNAs das diferentes linhagens celulares. Após o fracionamento destes mRNAs em gel de agarose e a transferência destes para a membrana, fez-se uma hibridização com sonda radioativa correspondente a TAM67 e ao controle interno 36B4. A expressão do dominante negativo de cJun (TAM67) pode ser observada nas linhagens MTJ27, MTJ30 e MTJ32. O mRNA do cJun endógeno está indicado na figura.

É importante ressaltar que nos clones MTJ4 e MTJ16 também foi detectado o transcrito correspondente a TAM67 por meio dos ensaios de Northern-blot (dados não mostrados).

Para mostrar que a proteína mutada está sendo expressa de forma ativa e exercendo seu papel no bloqueio da atividade constitutiva do complexo de transcrição AP-1, foram realizados ensaios de transfecção transiente, nos clones MTC, MTJ e nas linhagens controle PLJ e MTWT, com um vetor que contém uma seqüência específica de ligação ao DNA cis-ativa, correspondente ao elemento responsivo a AP-1. Este elemento está localizado "upstream" em relação à região promotora TATA-like do promotor de timidina quinase do vírus de herpes simplex (HSV-TK), regulando a expressão do gene repórter da fosfatase alcalina secretada (SEAP) (Clontech). Utilizar esta construção com gene repórter fosfatase, especificada acima, em ensaios de transfecção, possibilitou a análise da atividade

do complexo de transcrição AP-1 nos clones transfetados com a construção contendo o dominante negativo de cJun (MTJ) e nos clones controle (MTC).

Foram utilizados plasmídeos controles: a) o plasmídeo pSEAP2-Control (Clontech), que possui o promotor do gene *SV40* clonado "upstream" e um elemento enhancer, também do gene *SV40*, localizado "downstream" em relação ao gene repórter SEAP. Este plasmídeo expressa constitutivamente fosfatase alcalina secretada (SEAP) em muitos tipos celulares, sendo, portanto, uma construção adequada para otimizar os experimentos de transfecção e funcionando como controle positivo nos experimentos; b) o plasmídeo pSEAP2-Basic (Clontech), o qual possui o gene SEAP sem nenhum promotor ou enhancer, funcionando deste modo como controle negativo dos experimentos e, c) o plasmídeo pGL3-SV40 (Promega), que possui o promotor do gene *SV40* clonado "upstream" em relação ao gene repórter da luciferase. Este plasmídeo foi utilizado para a normalização da medida da atividade da fosfatase, já que a atividade da luciferase refletirá a eficiência de transfecção conseguida nos ensaios.

Os ensaios de transfecção transiente foram realizados como descrito em Materiais e Métodos (item 3.11) e os resultados obtidos estão indicados na figura 17.

Atividade do complexo de transcrição AP-1

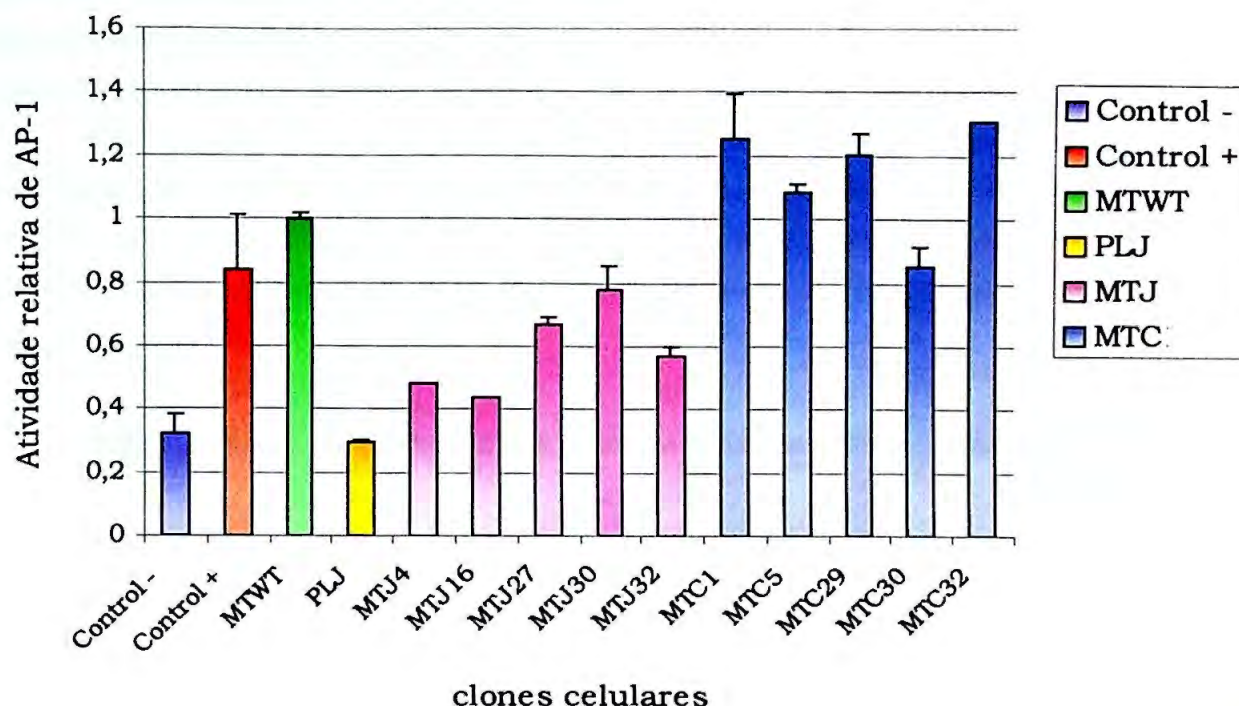


Fig 17: Atividade do complexo de transcrição AP-1 nos diferentes clones celulares. Ensaio de transfecção transiente utilizando 1,25 μ g de DNA nas diferentes linhagens celulares. Após a transfecção realiza-se a lise celular e as amostras são quantificadas utilizando-se um luminômetro. O bloqueio da atividade constitutiva do complexo AP-1 pode ser observado nos clones que expressam o dominante negativo de cJun (TAM67), clones MTJs. A barra de erro representa o desvio padrão das medidas obtidas de pelo menos três experimentos independentes.

Observa-se que a linhagem que expressa a proteína MT do vírus polioma (MTWT) apresenta uma elevada atividade de AP-1 em relação à célula controle PLJ, como descrito anteriormente (Oliveira et al., 1998). Observa-se que os clones derivados da transfecção com o mutante dominante-negativo de cJun (clones MTJs) apresentam diminuição na atividade de AP-1 em relação a linhagem MTWT, porém os clones controle MTC apresentam níveis de ativação de AP-1 similares à linhagem parental MTWT. Foram realizados testes estatísticos (item 3.19) entre os dois grupos de clones MTC e MTJ onde foi verificado que os valores

encontrados para a atividade de AP-1 nestes grupos de clones são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Desta maneira pode-se observar o bloqueio da atividade constitutiva de AP-1 nos clones MTJ derivados da transfecção com o mutante dominante-negativo de cJun.

Uma vez confirmado que os clones MTJ têm a atividade constitutiva de AP-1 bloqueada pelo dominante negativo de *c-jun*, procedemos os ensaios de proliferação celular comparando os clones MTC e MTJ para verificar se o bloqueio da atividade constitutiva de AP-1 resulta no bloqueio da atividade transformante do antígeno MT.

4.3) Análise do potencial de proliferação dos clones celulares obtidos

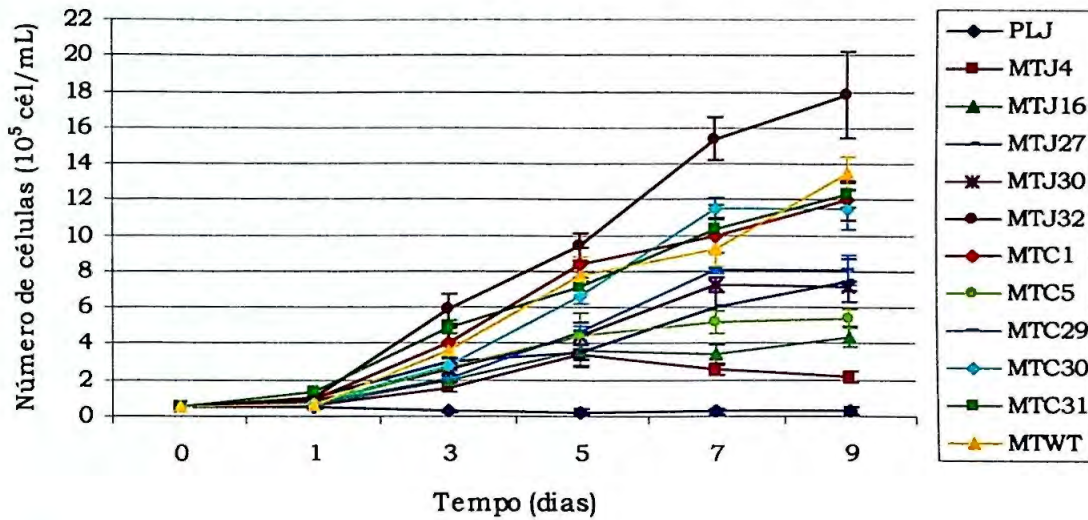
Fibroblastos normais, em cultura, dependem de concentrações de soro no meio de cultura ao redor de 10% para proliferar. O perfil de crescimento das linhagens estudadas neste trabalho foi analisado através de curvas de crescimento celular.

Neste experimento, quantidades iguais de células foram plaqueadas em meio contendo baixa (0,5%) ou alta (10%) concentração de soro. A cada dois dias, triplicatas de cada linhagem celular foram coletadas e contadas com o auxílio de um contador eletrônico de células. A figura 18 mostra as curvas de crescimento obtidas para os diferentes clones MTC e MTJ.

Os parâmetros de linhagem celular normal e linhagem celular transformada utilizados são, respectivamente, os das linhagens PLJ e MTWT. Percebe-se que a expressão de MT (linhagem MTWT) leva à independência de fatores de crescimento presentes no soro para proliferar. Por outro lado, a linhagem controle PLJ não foi capaz de proliferar em meio contendo baixa concentração de soro (0,5%).

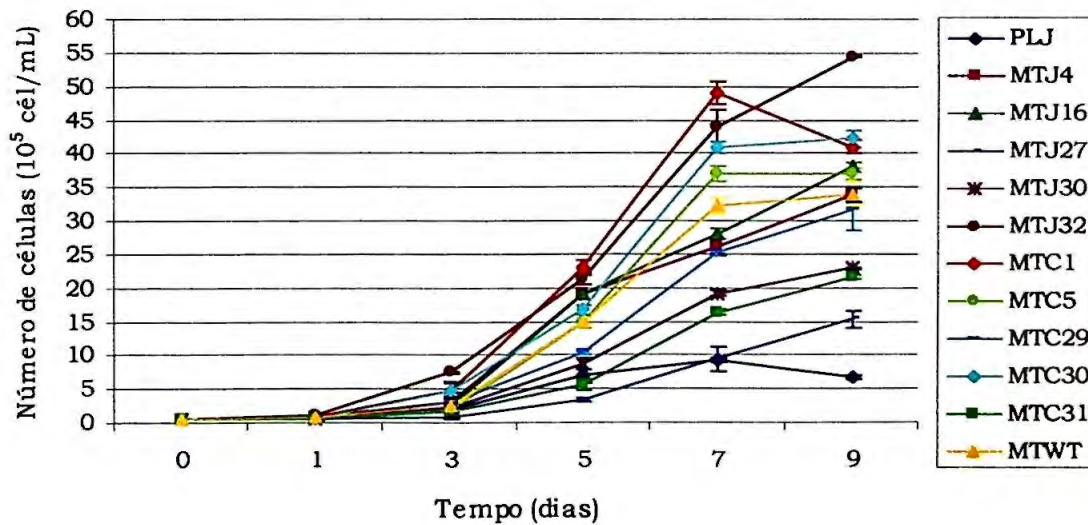
Verifica-se que os clones celulares obtidos a partir da transfecção do vetor pCMV-67 (clones MTJ) ou do vetor pCMV vazio (clones MTC) são capazes de proliferar em DMEM-0,5%FCS.

Curva de crescimento 0,5% SFB-DMEM



a

Curva de crescimento 10% SFB-DMEM



b

Fig. 18: Perfil do crescimento das linhagens celulares na presença de diferentes concentrações de soro. O mesmo número de células (5×10^4 cél/placa) de cada linhagem celular foi plaqueado e as culturas foram mantidas em: (a) baixa concentração de soro (0,5%) ou (b) alta concentração de soro (10%). Triplicatas de cada condição foram coletadas por tripsinização, nos tempos indicados e contadas com o auxílio de um contador eletrônico de células CELM. A barra de erro representa o desvio padrão das medidas obtidas.

Observa-se que os clones controles MTC1, MTC30 e MTC31 apresentam uma curva de crescimento em meio com baixa concentração de soro (0,5%-FCS) (Fig. 18a) similar à da linhagem MTWT, enquanto que os clones MTC5 e MTC29 apresentam curvas de crescimento similares aos clones MTJ4, MTJ16, MTJ27 e MTJ30, os quais tiveram capacidade de crescimento diminuída quando comparadas com a mesma linhagem selvagem. Nota-se porém, que o clone MTJ32 apresentou capacidade de crescimento superior a própria linhagem MTWT (selvagem). Nenhuma das linhagens analisadas foi incapaz de proliferar, como ocorre com a linhagem controle PLJ.

A inibição do crescimento devido ao aumento de densidade celular, característica marcante de uma célula normal, assim como o tempo de dobramento de cada clone celular foi analisado. Os dados obtidos estão indicados na tabela 3.

Tabela 3. Comparação dos tempos de dobramento e densidades de saturação dos diferentes clones analisados.

<i>Linhagem celular</i>	<i>Tempo de dobramento em 10% de soro (horas) *</i>	<i>Densidade de saturação (Nº. de células X 10⁵/cm² **)</i>
PLJ	24	0,7
MTJ4	16	3,4
MTJ16	12	3,8
MTJ27	21	1,6
MTJ30	24	2,4
MTJ32	30	5,7
MTC1	20	4,1
MTC5	13	3,7
MTC29	27	3,3
MTC30	26	4,3
MTC31	29	2,2
MTWT	16	3,5

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

** Média do número de células por cm²

Não foi observado, em nenhum dos clones MTC e MTJ, inibição do crescimento por aumento da densidade celular, sendo que alguns clones MTJs apresentaram uma densidade de saturação até maior que a própria linhagem transformada MTWT (Tabela 3). Da mesma forma, não foi observada nenhuma correlação do tempo de dobramento entre os grupos de clones MTC e MTJ.

Devido a alteração morfológica marcante nos clones MTJs esperava-se uma alteração na sua capacidade proliferativa, mas ao contrário, não foi observada nenhuma diferença na tendência de capacidade proliferativa entre os clones MTC e MTJ, sugerindo, portanto, que a presença ou ausência do mutante dominante negativo de cJun não interfere com a capacidade proliferativa das células em substrato sólido.

Uma característica comum à maioria das células transformadas é a capacidade de crescer em substrato semi-sólido. Esta capacidade pode ser testada através do plaqueamento das células em uma mistura de agarose e meio de cultura que é colocada abaixo e acima da camada celular, de forma que as células fiquem isoladas, sem adesão ao substrato. O meio de cultura é renovado a cada três dias e as colônias formadas são então observadas com o auxílio de um microscópio invertido.

As figuras 19 e 20 mostram o resultado do crescimento das células em suspensão após duas semanas de cultivo. Observa-se que as linhagens celulares MTWT e MTCs foram capazes de formar diversas colônias em meio semi-sólido (Fig. 19). As linhagens celulares derivadas da transfecção com o vetor pCMV-67 (clones MTJ) foram capazes de crescer em suspensão formando colônias muito pequenas (Fig. 20).

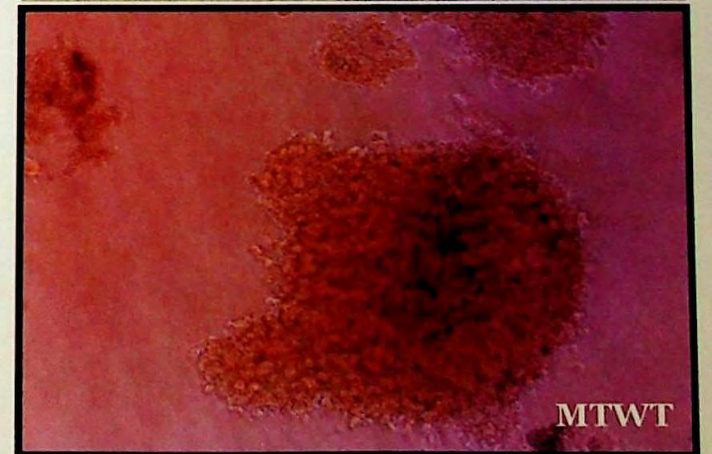
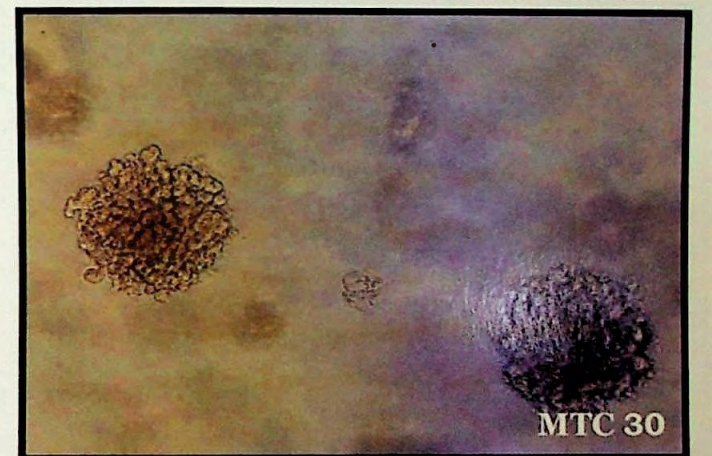
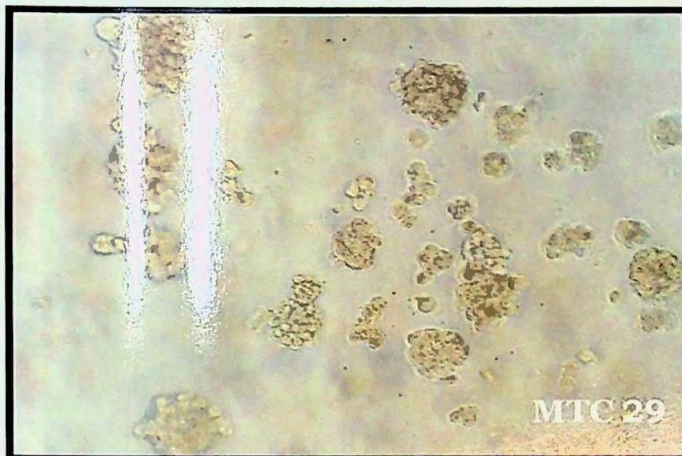
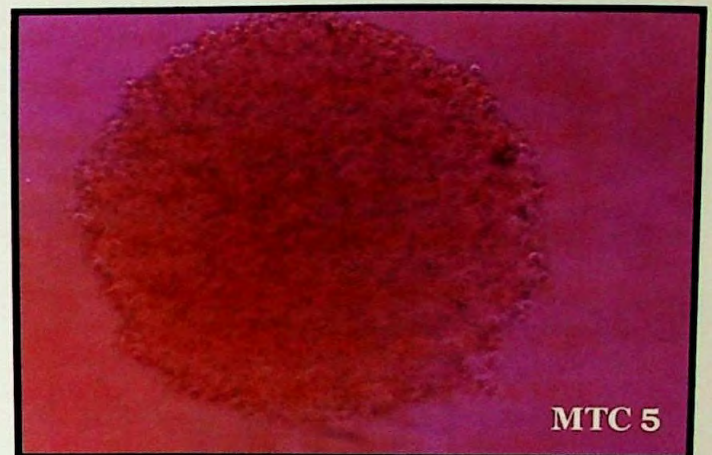
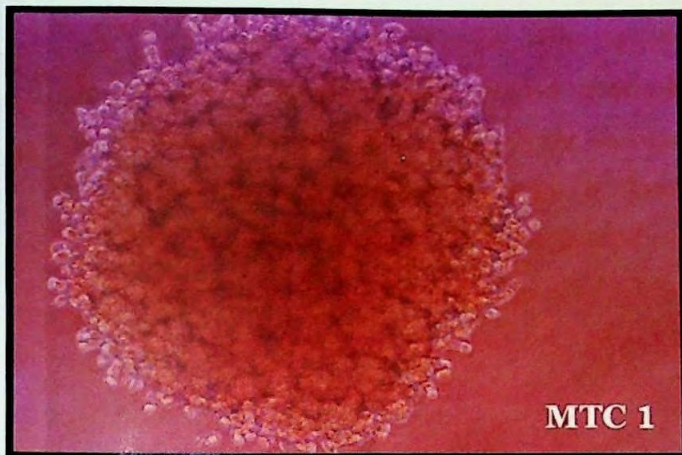


Fig. 19: Crescimento em suspensão de agarose- clones MTC. A transfecção da linhagem MTWT com o vetor pCMV vazio não afeta a capacidade das células de formar colônias em meio semi-sólido. Foram plaqueadas 10^3 células em 0,6% agarose-DMEM-10%FCS e cobertas com 0,3% agarose-DMEM-10%FCS, sendo mantidas em cultura por 2 semanas. As fotos foram obtidas em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento: 100X).

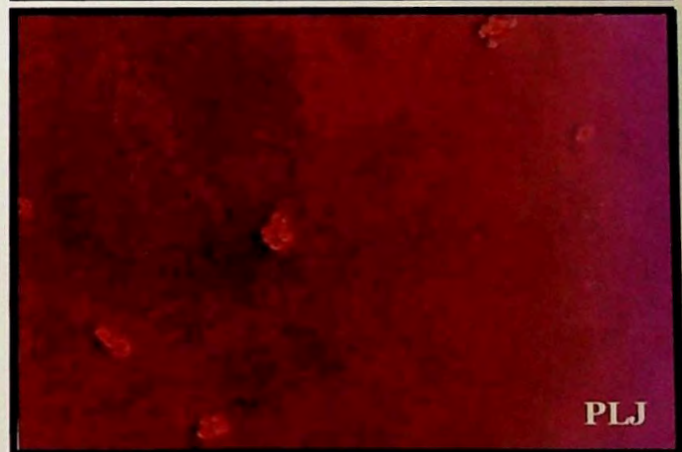
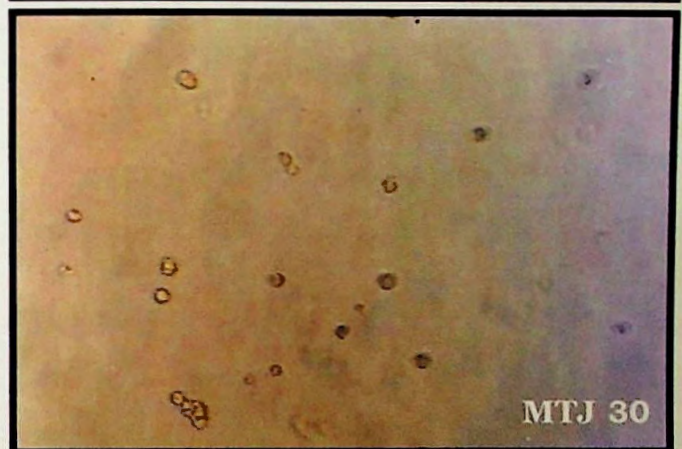
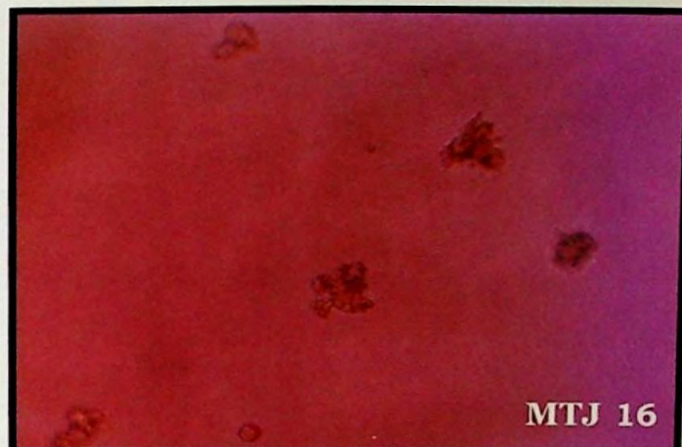


Fig. 20: Crescimento em suspensão de agarose- clones MTJ. A transfecção da linhagem MTWT com o vetor pCMV-67 proporcionou uma dramática inibição da capacidade destas células de formar colônias em meio semi-sólido. Foram plaqueadas 10^3 células em 0,6% agarose-DMEM-10%FCS e cobertas com 0,3% agarose-DMEM-10%FCS, sendo mantidas em cultura por 2 semanas. As fotos foram obtidas em microscópio invertido Nikon Diaphot (aumento: 100X).

Assim, os clones MTJs apresentaram uma capacidade de crescimento em meio semi-sólido bastante reduzida em comparação com os clones controle e a linhagem MTWT.

Deve-se salientar que, de todos os parâmetros de transformação celular, o que melhor correlaciona com o potencial tumorigênico *in vivo* é a capacidade de crescimento em meio semi-sólido.

Estes resultados mostram a importância do complexo de transcrição AP-1 durante a transformação celular mediada pelo antígeno MT, sugerindo que mecanismos distintos controlam a capacidade de crescer em baixa concentração de soro (0,5%) e a capacidade de formar colônias em meio semi-sólido de agarose.

4.4) Análise do envolvimento da LMW-PTP na transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma

O balanço entre fosforilação e desfosforilação de proteínas é um dos pontos chave para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares como fatores peptídicos de crescimento e hormônios. Em particular, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de tirosina em proteínas têm emergido como um evento crucial na regulação da divisão, diferenciação e expressão gênica (Byon *et al.*, 1997, Hunter, 1998).

A ação catalítica das PTPs contrapõe-se à atividade das PTKs envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular. Devido à ação anti-proliferativa de várias PTPs, os genes codificadores destas enzimas têm sido considerados como genes supressores de tumor (Ramponi & Stefani, 1997).

Como mencionado anteriormente, a proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP) tem sido implicada no controle do ciclo celular (Granjeiro *et al.*, 1997; Ramponi e Stefani, 1997), tendo sido sugerido seu envolvimento na desfosforilação do receptor do PDGF (Bucciantini *et al.*, 1998).

Sabendo-se que, na transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma diversas vias de transdução de sinal estão envolvidas e que este antígeno tumoral mimetiza o papel do PDGF, decidimos, em colaboração com o Prof. José Mauro Granjeiro (Faculdade de Odontologia- USP Bauru), analisar o

papel da LMW-PTP na transformação de células Balb-3T3 mediadas pelo antígeno MT do vírus polioma.

A linhagem MTWT e a linhagem controle PLJ, especificadas anteriormente, foram utilizadas nestes experimentos. As duas linhagens celulares foram plaqueadas, em triplicatas, e cultivadas até atingirem a subconfluência. As células foram coletadas e o extrato protéico preparado como descrito em materiais e métodos. A atividade específica da LMW-PTP nestas duas linhagens foi determinada (como descrito no item 3.17). A normalização deste experimento foi feita de acordo com a quantidade de proteína obtida em cada extração.

A figura 21 mostra os resultados obtidos de atividade da LMW-PTP para a linhagem que expressam o antígeno MT do vírus polioma, assim como a linhagem controle PLJ.

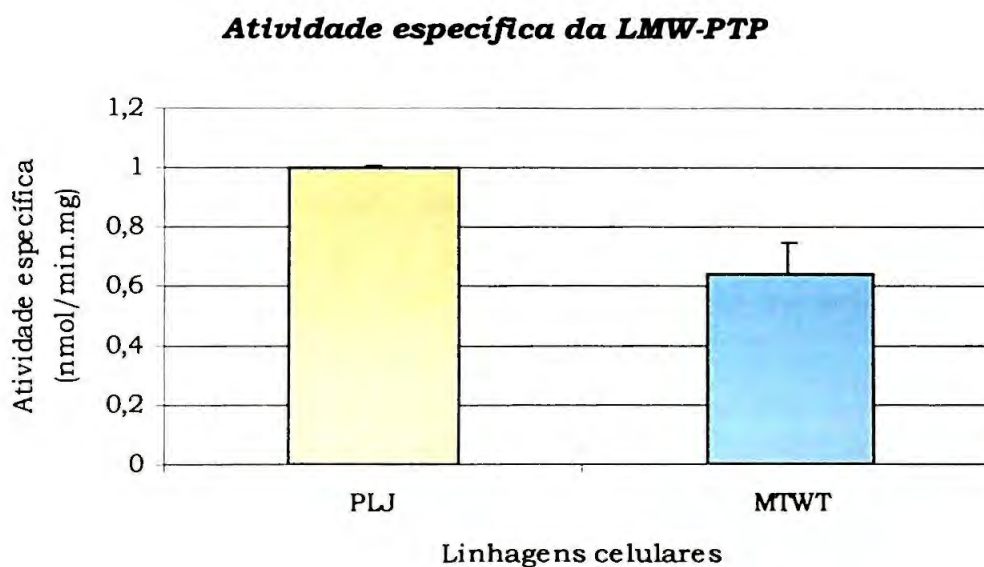


Fig. 21. Atividade específica da LMW-PTP em células que expressam o antígeno MT do vírus polioma. As diferentes linhagens foram plaqueadas em placas P150 (em triplicatas), mantidas em DMEM-10%FCS e coletadas na subconfluência. PLJ - linhagem controle. MTWT – linhagem que expressa a proteína MT selvagem do vírus polioma. A barra representa o desvio padrão das medidas obtidas.

Foi verificado, utilizando análises estatísticas (item 3.19), que a expressão da proteína MT selvagem (linhagem MTWT) provoca uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 38% na atividade da LMW-PTP em relação à linhagem controle PLJ.

4.5) Análise da expressão da LMW-PTP na linhagem celular que expressa a proteína MT do vírus polioma

A fim de compreender melhor as alterações na atividade da LMW-PTP mediadas pela expressão do antígeno MT do vírus polioma, foi determinado o nível de transcrito desta enzima nas duas linhagens celulares. As células foram cultivadas em meio contendo 10% de soro e coletadas na subconfluência. O mRNA foi extraído, fracionado em gel de agarose-formaldeído e transferido para a membrana de nylon. Realizou-se uma hibridização da membrana com sonda radioativa correspondente ao gene da LMW-PTP (1,5Kb). Para normalizar a quantidade de mRNA correspondente a cada linhagem utilizou-se sonda radioativa correspondente ao gene de expressão constitutiva da glicoproteína ribossomal ácida (36B4) (Fig. 22).

A análise densitométrica das bandas indicou que as razões LMW-PTP/36B4 estão ao redor de 1 nas duas linhagens celulares analisadas, sugerindo que não há alteração significativa no nível de transcrito da LMW-PTP nestas linhagens.

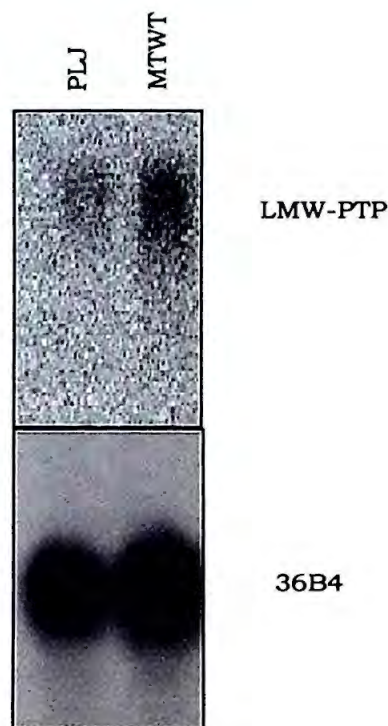


Fig. 22: Expressão da LMW-PTP em células que expressam o antígeno MT do vírus polioma. Ensaio de Northern-blot utilizando 2 μ g de mRNAs das diferentes linhagens celulares. Após o fracionamento destes mRNAs em gel de agarose-formaldeído e a transferência destes para a membrana de nitrocelulose, fez-se uma hibridização com sonda radioativa correspondente ao gene da LMW-PTP. Para a normalização da quantidade de mRNA aplicada utilizou-se sonda radioativa correspondente ao gene de expressão constitutiva da glicoproteína ribossomal ácida (36B4).

Verificou-se, portanto, que a diminuição na atividade específica da LMW-PTP na linhagem transformada MTWT, provavelmente, deve ter sido causada por outro fator que não a regulação de sua expressão no nível transcricional.

4.6) Análise do nível de estresse oxidativo na linhagem que expressa o antígeno MT do vírus polioma

Sabe-se que a ligação de moléculas a uma variedade de receptores de superfície na membrana, incluindo fatores de crescimento e citocinas, induzem

um aumento transitório na concentração de espécies reativas de oxigênio em células de mamíferos (Lo *et al.*, 1996, Sundaresan *et al.*, 1996, Bae *et al.*, 1997). A inibição deste efeito bloqueia a transdução de sinal. Assim, por exemplo, inibindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio pela introdução de catalase em células NIH-3T3 ou A431, evita-se a indução da fosforilação de proteínas em tirosina induzida pelo fator de crescimento epidermal (EGF) (Sundaresan *et al.*, 1996, Bae *et al.*, 1997). Por outro lado, a exposição direta das células ao H₂O₂ aumenta a fosforilação de proteínas em tirosina e ativa as vias de transdução de sinal (Sundaresan *et al.*, 1996, Bae *et al.*, 1997).

Uma vez que o conteúdo de proteínas fosforiladas em tirosina depende de um balanço entre as atividades de tirosina quinases e tirosina fosfatases, a ativação da tirosina quinase ou inibição da tirosina fosfatase irá deslocar o equilíbrio para a fosforilação.

É sabido que peróxido de hidrogênio inibe a atividade LMW-PTP (Caselli *et al.*, 1998). Este efeito está relacionado com a presença de um grupo sulfidril ionizado (ânion tiolato) no sítio ativo/assinatura de toda esta classe de enzimas (HCXXXXXR(S/T)). Este grupo tiol tem o papel de ligar o fosfato do substrato durante a catálise, formando um intermediário fosfo-tiol-enzima. Caselli e colaboradores (1998) demonstraram que a LMW-PTP também é inibida por H₂O₂ devido à oxidação das Cys-12 e Cys-17 (presentes no sítio ativo da enzima) com a consequente formação de ponte dissulfeto e mudança conformacional da enzima.

Uma vez que este efeito ocorreu em concentrações fisiológicas do peróxido de hidrogênio, diversos autores sugerem que este mecanismo seja responsável pela regulação da atividade das enzimas proteínas tirosinas fosfatases nas células.

Glutationa (GSH) é um abundante composto tiólico de baixo peso molecular encontrado em plantas e animais, não apresentando a toxicidade da cisteína. Isto torna a GSH um desejável “tampão redox” tiólico da célula, que após oxidação é convertida a GSSG (glutationa dissulfeto ou, mais comumente, glutaciona oxidada). A GSH tem seu papel relacionado com a transdução de sinal, expressão gênica e apoptose (Sies, 1999).

Uma vez que o balanço entre glutaciona reduzida/oxidada pode ser utilizado como uma medida indireta do estado redox global da célula ou tecido

(Sies, 1999), decidiu-se determinar a razão $GSH/(GSH+2GSSG)$ na linhagem MTWT para verificar se o estresse oxidativo poderia ser o mecanismo pelo qual o antígeno MT estaria diminuindo a atividade das PTPs.

Neste experimento as células foram mantidas em meio contendo 10% de soro e coletadas na subconfluência. O conteúdo de GSH e $GSH/+2GSSG$ foi obtido conforme descrito em materiais e métodos. A normalização foi realizada pelo conteúdo de proteína em cada condição. A figura 23 mostra os resultados obtidos para as duas linhagens celulares analisadas:

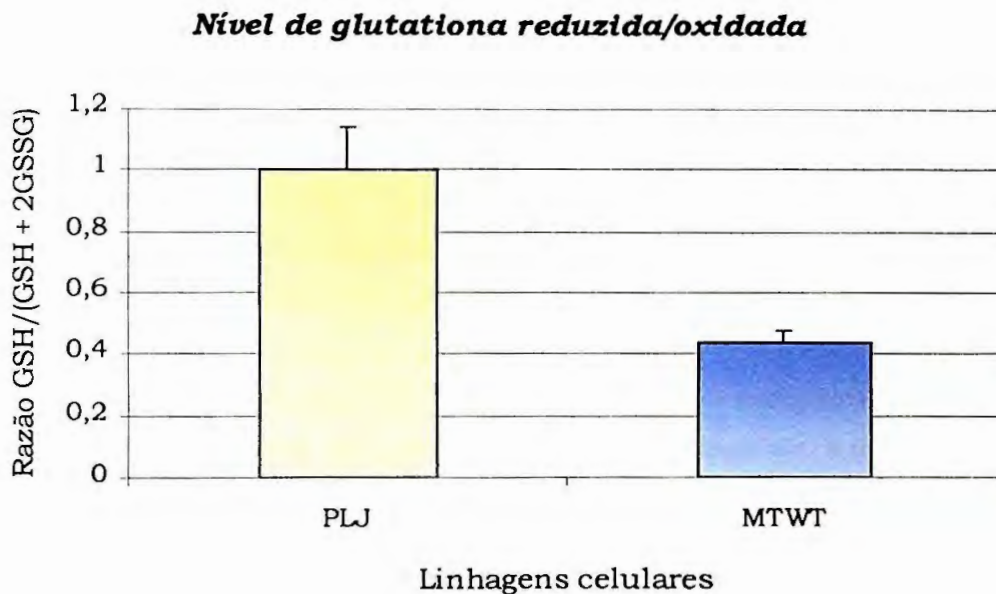


Fig. 23. Análise do conteúdo de glutathiona reduzida/oxidada em células transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma. As células foram plaqueadas em placas P150, em triplicata, mantidas em DMEM-10%FCS e coletadas na sub-confluência, como descrito em materiais e métodos. A barra representa o desvio padrão das medidas obtidas.

Verificou-se que há uma diminuição significativa ($p < 0,001$) de 53% da relação $GSH/(GSH+2GSSG)$ na linhagem transformada MTWT, em relação a linhagem controle PLJ, indicando um estado oxidativo mais elevado nesta linhagem.

5) Considerações Finais

O estudo dos vírus tumorais contribuiu de forma decisiva para o entendimento do processo tumoral e do controle normal da proliferação celular. Estes vírus continuam sendo utilizados como modelos de estudo, por transformarem reprodutivamente células em cultura, além de induzirem a formação de tumores em animais experimentais.

O papel de cada um dos antígenos tumorais do vírus polioma foi extensamente estudado através da utilização de vírus mutantes, ou, mais recentemente, da expressão destes antígenos (separadamente ou em conjunto) em linhagens celulares. Diversos destes estudos apontam o antígeno MT como responsável pela transformação celular de linhagens estabelecidas em cultura. MT é capaz de se associar e modular a atividade de diversas proteínas celulares específicas. A importância da associação de MT a estas proteínas durante a transformação celular, foi analisada através do uso de mutantes de MT defectivos para a ligação a estas proteínas específicas (revisto por Armelin & Oliveira, 1996, Oliveira *et al.*, 1998).

A expressão do antígeno MT promove a ativação constitutiva do complexo de transcrição AP-1 (Rameh & Armelin, 1992). A análise de linhagens celulares que expressam mutantes de MT defectivos para a associação à diversas proteínas celulares, além do uso de inibidores específicos para determinadas vias de transdução de sinal, permitiram determinar que a associação de MT à subunidade regulatória da enzima PI3K é essencial para a ativação constitutiva de AP-1 (Oliveira *et al.*, 1998).

O complexo de transcrição AP-1 tem se mostrado um alvo de MT, porém a ativação deste complexo não é suficiente para conferir um fenótipo transformado, já que mutantes de MT defectivos para a transformação apresentam atividade de AP-1 constitutivamente elevada, similares à linhagem MTWT (Oliveira *et al.*, 1998), sugerindo, portanto, a existência de outros eventos importantes ainda não identificados.

A necessidade de ativação do complexo de transcrição AP-1 pelo antígeno MT para mediar todo o processo de transformação maligna foi analisada, no presente trabalho, através do bloqueio da atividade constitutiva de AP-1 nas

células MTWT, utilizando um mutante dominante-negativo da proteína cJun (um dos componentes do complexo AP-1). O efeito da inibição da atividade de AP-1 foi analisado mediante alguns parâmetros de transformação maligna, como, por exemplo: características morfológicas, capacidade proliferativa em substrato sólido e capacidade de crescimento em meio semi-sólido de agarose.

Como a fosforilação de proteínas em tirosina é um evento frequentemente associado com a proliferação celular e, sendo este efeito o resultado de um balanço entre a atividade de proteínas tirosinas quinases e proteínas tirosinas fosfatases, decidiu-se analisar o papel LMW-PTP na transformação maligna induzida pelo antígeno MT do vírus polioma. O envolvimento desta PTP na transformação maligna mediada por MT foi analisada através das medidas de atividade específica da fosfatase nas células MTWT, através de análises da expressão da mesma em ensaios de Northern-blot e do nível de estresse oxidativo a que estas células estão sendo submetidas mediante a expressão do antígeno MT e indução da transformação celular.

5.1) Papel do complexo de transcrição AP-1 na transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma.

O bloqueio da atividade constitutiva do complexo de transcrição AP-1 nas células que expressam a proteína MT do vírus polioma foi obtido através da transfecção da linhagem MTWT com um mutante dominante-negativo de cJun (TAM67).

A expressão do mutante TAM67 na linhagem transformada MTWT, promoveu uma mudança morfológica dramática nestas células, tendo sido obtidos clones celulares (MTJ) que formam monocamadas em substrato sólido, constituídos de células maiores, que aderem melhor ao substrato, com semelhanças à fibroblastos normais.

Os clones celulares MTJ apresentaram capacidade reduzida de crescimento em meio semi-sólido de agarose, quando comparados aos clones controle (MTC) e à linhagem MTWT. Deve-se salientar que, de todos os parâmetros de transformação celular, o que melhor correlaciona com o potencial tumorigênico *in vivo* é a capacidade de crescimento em meio semi-sólido.

A expressão do mutante TAM67 nos clones celulares MTJ não bloqueou a capacidade proliferativa dos mesmos em substrato sólido, sendo mantidas as características das células transformadas (MTWT), como por exemplo a falta de inibição do crescimento mediante a baixa concentração de soro presente no meio de cultura.

Estes resultados mostram a necessidade da atividade constitutiva de AP-1 durante a transformação celular mediada pelo antígeno MT, pois o bloqueio da formação do complexo AP-1 constitutivamente ativo possibilitou o bloqueio de algumas características essenciais à transformação maligna, como, por exemplo, a capacidade de proliferação em meio semi-sólido. Os resultados sugerem que durante a transformação maligna induzida por MT mecanismos distintos controlam a capacidade de crescer em baixa concentração de soro (0,5%) e a capacidade de formar colônias em meio semi-sólido de agarose.

A análise da expressão do mutante dominante-negativo de cJun (TAM67) nos vários clones celulares, por ensaios de Northern-blot, revelou que entre os diversos clones obtidos não foi possível a detecção do transcrito correspondente à TAM67 na maioria deles (dados não mostrados). Uma possível explicação para isto, é o fato de que, provavelmente, a maioria dos clones obtidos não apresentaram uma expressão suficientemente alta da proteína mutante para permitir a sua visualização em experimentos de Northern-blot.

Estes dados sugerem que a transfecção com o mutante dominante-negativo de cJun nas células MTWT está, provavelmente, bloqueando sua capacidade proliferativa, na medida em que bloqueia cJun/AP-1, impedindo os clones que mais expressavam a proteína mutante de crescerem e serem isolados.

Este tipo de efeito é inerente ao método de transfecção e isolamento de clones utilizado. Porém, este efeito não invalida os resultados aqui obtidos já que o nosso objetivo, de bloquear a ativação constitutiva de AP-1 na linhagem MTWT, foi atingido, e os efeitos deste bloqueio constitutivo, levando à uma atividade de AP-1 mais próxima às condições de uma célula normal, puderam ser analisados e mostraram a necessidade da atividade constitutiva de AP-1 para transformação celular induzida pelo antígeno MT do vírus polioma.

Os membros da família Jun, especialmente cJun, assim como o complexo de transcrição AP-1, estão sendo descritos como alvo da transformação celular

também em outros sistemas celulares. Recentemente foi descrito o envolvimento dos membros da família Jun, especialmente cJun e JunB, em adenocarcinoma coloretal humano (Wang *et al.*, 2000). Tem sido sugerido também o envolvimento de proteínas da família Jun/AP-1 na progressão da carcinogênese de pele de camundongo, onde os altos níveis da proteína cJun fosforilada e JNKs puderam ser relacionados com a progressão do tumor e com características mais agressivas do fenótipo neoplásico (Zoumpourlis *et al.*, 2000).

5.1.1) Mecanismo de ativação de AP-1 mediado por MT.

A proteína MT do vírus poliomia recruta diversas proteínas celulares, incluindo quinases membros da família Src, PI3K e Ras, envolvidas na regulação da sinalização celular, levando à sua ativação. A ativação destas proteínas celulares é requerida para a transformação celular induzida por MT.

Ativação da proteína Ras, levando à cascata de sinalização de MAPKs até a ativação de ERKs, as quais são translocadas para o núcleo onde vão ativar diversos promotores de genes específicos (como *fos*), é relativamente bem conhecida; contudo a ativação do complexo de transcrição AP-1 nas células transformadas pelo antígeno MT do vírus poliomia parece não resultar apenas da ativação de Erks.

Foi verificado que uma linhagem celular que expressa o antígeno MT mutado na Tyr-250, tornando-o incapaz de interagir com a proteína Shc (e consequentemente, defectivo para a ativação de Ras) é capaz de induzir uma atividade de AP-1 constitutivamente alta, em níveis comparáveis àquela da linhagem MTWT, apesar da atividade de Erk-1 ser relativamente baixa (Oliveira *et al.*, 1998). Da mesma forma, um mutante de MT defectivo para a interação com Shc, expresso em fibroblastos NIH-3T3, não foi capaz de induzir a translocação de Erk-1 para o núcleo, mas foi capaz de ativar o promotor do ativador de plasminogênio tipo-uroquinase (uPA) que contém sequências consenso para ligação de AP-1 (Urich *et al.*, 1995).

A ativação de outras quinases (que não Erk-1) surge como uma possibilidade para levar o sinal até AP-1.

Além de um aumento na expressão, modificações pós-traducionais (essencialmente fosforilação dos resíduos de Ser-63 e Ser-73, presentes no domínio de transativação e desfosforilação dos resíduos de Ser-243, Ser249 e Thr-231, presentes no domínio de ligação ao DNA) das proteínas Jun, constituem outra forma de regulação da atividade transcricional destas proteínas. Alterações no padrão de fosforilação de cJun foram descritas em linhagens celulares que expressam Ras ou o antígeno MT do vírus polioma (Binétruy *et al.*, 1991; Srinivas *et al.*, 1994). Assim, uma expressão basal associada a eventos pós-traducionais pode levar à indução da capacidade de ligação ao DNA das proteínas Jun.

Sabendo que a fosforilação das proteínas Jun nos resíduos de Ser-63 e Ser-73 (a qual aumenta sua atividade transcricional) ocorre principalmente por ação de JNK e, em menor quantidade, por ação das Erks (Hibi *et al.*, 1993, Kallunki *et al.*, 1996), a ativação de AP-1 por MT, pode depender da ativação de JNK.

A cascata de ativação de MAPKs que leva à ativação de JNKs é uma via de sinalização, “downstream” em relação a Ras, paralela àquela envolvendo Raf (responsável pela ativação da Erks), que envolve a ativação da proteína MEKK (Minden *et al.*, 1994, Campbell *et al.*, 1998). A ativação de JNKs parece envolver uma proteína denominada Rac, um membro da família Rho de GTPases (Auer *et al.*, 1999). A ativação de *c-jun* por esta via tem sido descrita em outros sistemas. EGF medeia a ativação do promotor de *c-jun* via Ras/Rac/MEKK/JNK (Clarke *et al.*, 1998). Há evidências de que esta proteína Rac pode também ser ativada por PI3K (Ulrich *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1999) (Fig 24).

A associação de MT à subunidade regulatória da PI3K foi mapeada como sendo essencial para a ativação constitutiva de AP-1. O mutante MT315, defeitivo para esta associação, apresentou níveis basais baixos de AP-1, comparáveis à linhagem controle PLJ (Oliveira *et al.*, 1998). Além disso, a importância da interação de MT com a enzima PI3K na linhagem celular MTWT foi evidenciada através do uso de um inibidor específico de PI3K (wortmannin) nestas células, levando à inibição da ativação de AP-1 por MT (Oliveira *et al.*, 1998). Juntos, esses dados sugerem um papel importante da enzima PI3K, na transdução de sinal de MT até o fator de transcrição AP-1.

Recentemente tem sido visto a ativação de JNK-1 pelo receptor- β de PDGF ativado. Assefa e colaboradores (1999) utilizando mutantes de deleção do receptor- β de PDGF, assim como inibidores específicos de vias de transdução de sinal na célula, mostraram que a completa ativação de JNK-1, em células A431, é dependente da interação do receptor- β de PDGF com ambas as proteínas celulares PI3K e PLC- γ (Assefa *et al.*, 1999). Deste modo PI3K e PLC devem cooperar na ativação de JNK-1 em resposta a PDGF.

Além de fosforilação na região transativadora, as proteínas Jun precisam ser desfosforiladas na região de ligação ao DNA (resíduos de Ser-243, Ser-249 e Thr-231) para apresentar atividade transativadora. A enzima glicogênio sintetase quinase-3 β (GSK-3) é catalisadora da fosforilação de Jun nesses resíduos (deGroot *et al.*, 1992). A atividade de GSK-3 é inibida pela ação da enzima pp70^{S6K} (quinase da proteína S6 de ribossomo) a qual, por sua vez, sofre ativação por ação da PI3K (Sutherland *et al.*, 1993, Chung *et al.*; 1994, Romanelli *et al.*, 1999).

Linhagens que expressam o antígeno MT selvagem, apresentam uma alta atividade de pp70^{S6K}, dependente da associação de MT a PI3K, ou seja, linhagens que expressam o antígeno MT mutado na Tyr-315, tornando-o incapaz de interagir com a proteína PI3K, não são capazes de ativar pp70^{S6K} (Dahl *et al.*, 1996). Uma possibilidade é que a ativação de pp70^{S6K} por MT (via PI3K) leve à inibição de GSK-3, mantendo as proteínas Jun desfosforiladas no domínio de ligação ao DNA e, conseqüentemente, ativas. Um esquema das possíveis vias de ativação das proteínas Jun por MT (dependentes de PI3K) está representado na Figura 24.

O uso de dominantes-negativos ou de inibidores das proteínas Rac, GSK-3 ou pp70^{S6K}, ou mesmo a análise de possíveis JNKs que podem ser ativadas por MT poderiam contribuir para desvendar o mecanismo de ativação do complexo de transcrição AP-1 durante a transformação maligna induzida pelo antígeno MT do vírus polioma.

Por outro lado, a análise dos possíveis alvos moleculares do complexo AP-1 constitutivamente ativo pelo antígeno MT do vírus polioma nos leva à outras questões relevantes. Tem sido descrito o envolvimento da proteína cJun na progressão de fibroblastos pela fase G1 do ciclo celular através de mecanismos

que envolvem, pelo menos em parte, o controle transcricional do gene da *ciclina D1* (sítios AP-1 presentes no promotor do gene da *ciclina D1* parecem mediar os efeitos de cJun) (Wisdom *et al.*, 1999). A ativação transcricional do gene da *ciclina D1* tem sido relatado em diversos sistemas de transformação celular, tendo sido novamente sugerido o envolvimento de cJun/AP-1 (Watanabe *et al.*, 1996, Albanese *et al.*, 1999).

Assim, um dos alvos de cJun/AP-1 deve ser o gene da *ciclina D1*, cuja ativação promove a progressão das células pelo ciclo celular, levando à proliferação/transformação. Desta maneira, tem sido estabelecido um “link” entre sinalização por fatores de crescimento e reguladores do ciclo celular.

A análise do envolvimento de *ciclina D1*, como um possível alvo do complexo AP-1 constitutivamente ativo por ação do antígeno MT, poderia elucidar melhor o papel do complexo de transcrição AP-1 neste modelo de transformação maligna.

O enfoque a estas questões contribuirão para melhor compreensão das bases moleculares da ação transformante do antígeno MT do vírus polioma.

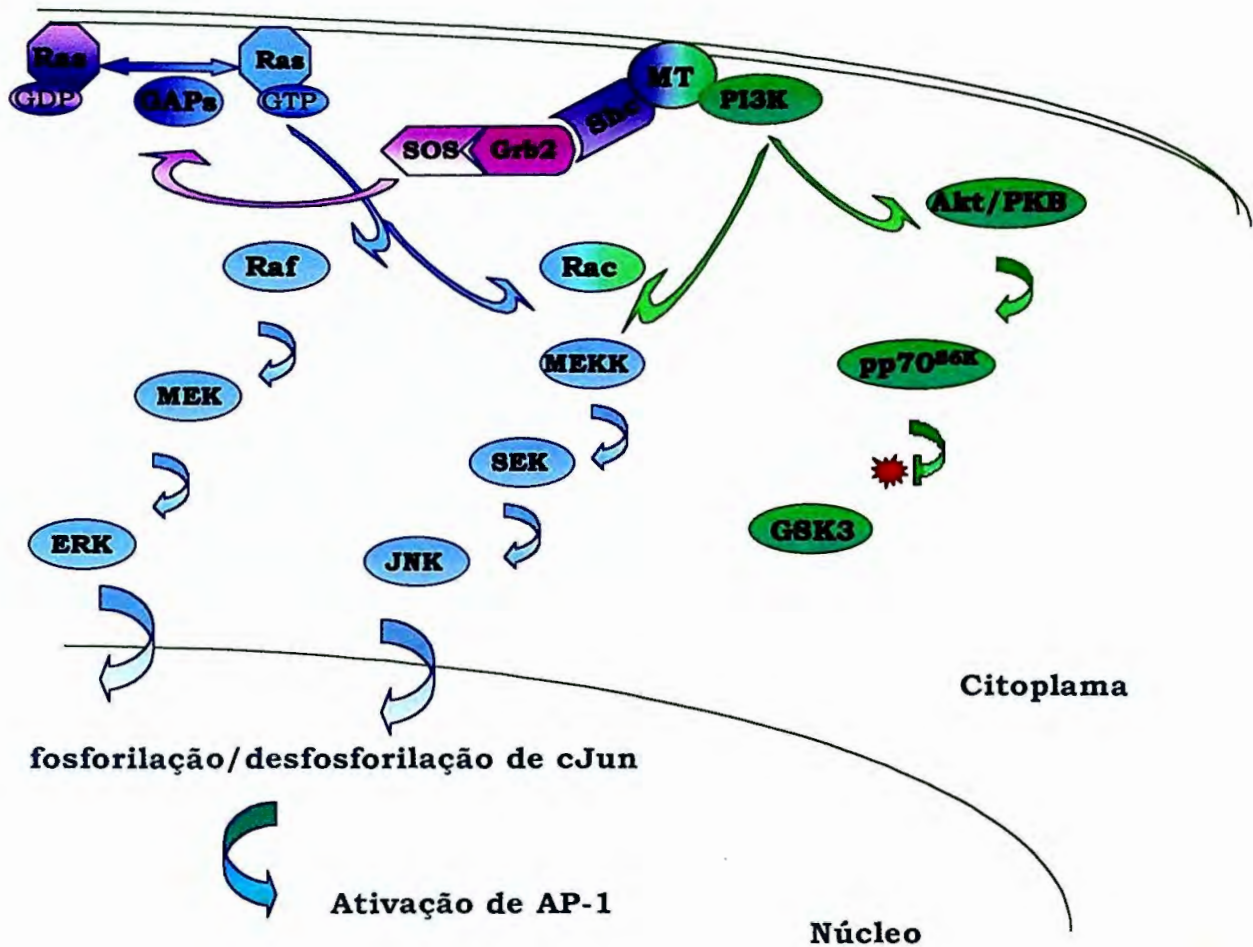


Fig. 24: Regulação da fosforilação das proteínas da família Jun. Esquema das possíveis vias utilizadas por MT. A ativação de PI3K pode levar a ativação de Erks e consequente indução na expressão dos genes da família *jun*. A fosforilação de Jun é controlada pela ação das enzimas JNK e GSK3. A inativação de GSK3 por vias dependentes de PI3K foi mostrada em outros modelos celulares, mas não em células que expressam o antígeno MT do vírus polioma.

5.2) Papel da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular na transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma.

A proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP) interage especificamente com o receptor de PDGF auto-fosforilado, promovendo a desfosforilação do mesmo, sendo a responsável pela modulação da atividade mitogênica promovida por este agente (Rigacci *et al.*, 1998, Bucciantini *et al.*, 1998).

Tendo sido relatado um grande número de elementos comuns entre a resposta celular a PDGF e ao antígeno MT do vírus polioma (Kaplan *et al.*, 1987, Oliveira *et al.*, 1996), foi analisado o papel da LMW-PTP na transformação celular mediada por este antígeno tumoral. Verificou-se que células transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma (linhagem MTWT) apresentam uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade específica da LMW-PTP em relação à linhagem controle PLJ, sugerindo o envolvimento desta proteína tirosina fosfatase na transformação maligna mediada por este antígeno tumoral.

Como os experimentos de Northern-blot não revelaram modificações nos níveis de transcrito desta fosfatase entre as linhagens MTWT e PLJ, estes resultados sugerem que outro mecanismo, induzido durante a transformação celular mediada por MT, está sendo responsável pela inibição da atividade da LMW-PTP que não a sua regulação no nível transcricional ou ainda, regulação da estabilidade do mRNA.

Sabe-se que a LMW-PTP é inativada por espécies reativas de oxigênio, em particular peróxido de hidrogênio, o qual foi descrito agir diretamente no sítio ativo da enzima (Caselli *et al.*, 1998). Visto que a inativação da LMW-PTP por H_2O_2 foi promovida em concentrações fisiológicas do peróxido, foi sugerido que processos celulares que produzam peróxido de hidrogênio regulem a atividade da LMW-PTP na célula. Desta maneira, decidiu-se analisar o nível de estresse oxidativo de cada uma das linhagens celulares.

Sabendo que glutathiona desempenha um papel de tampão redox celular, decidiu-se analisar o nível de glutathiona reduzida/oxidada em cada uma das

linhagens celulares, como um indicador do balanço oxidativo a que as células estão submetidas.

Percebeu-se que a diminuição da atividade da LMW-PTP na linhagem MTWT pode, ao menos em parte, ser devida ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio nestas células, já que esta linhagem apresentou uma diminuição acentuada da relação $GSH/(GSH+2GSSG)$ quando comparado com a linhagem controle PLJ, indicando um estado mais oxidado nestas células.

Peróxido de hidrogênio é produzido por diversos tipos celulares em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, como os fatores peptídicos de crescimento, em especial por PDGF (Sundaresan *et al.*, 1995). Recentemente, foi descrito o envolvimento da via de PI3K na produção de peróxido de hidrogênio pelo receptor de PDGF ativado, sendo identificada a proteína Rac1 como um efetor “downstream” em relação a PI3K essencial para este efeito (Bae *et al.*, 2000).

Assim, os resultados sugerem o envolvimento da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP) no processo de transformação maligna mediada pelo antígeno MT do vírus polioma. Células transformadas pelo antígeno MT do vírus polioma apresentam uma diminuição da atividade da LMW-PTP podendo ser, ao menos em parte, devido ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio induzidos pelo processo de transformação celular.

Além das linhagens MTWT e PLJ utilizadas neste estudo, dispõe-se, no laboratório, de diferentes linhagens celulares que foram também originadas a partir da linhagem Balb-3T3 (clone de A31) e que expressam o gene que codifica para o antígeno MT mutado. Estas mutações foram introduzidas de tal forma a bloquear específicas vias de transdução de sinal a partir de MT. Todas essas mutações levam à uma redução na capacidade transformante do antígeno MT do vírus polioma (Oliveira *et al.*, 1998). A análise da atividade da LMW-PTP nestas diferentes linhagens celulares poderia contribuir muito para a elucidação do mecanismo pelo qual a transformação celular mediada por MT está influenciando na atividade desta enzima, podendo elucidar vias de transdução de sinal importantes para este efeito.

6) Conclusões

O bloqueio da ativação constitutiva do complexo de transcrição AP-1 nas células MTWT, utilizando uma proteína mutante dominante-negativa de cJun, proporcionou uma alteração morfológica dramática nestas células, tornando-as similares a fibroblastos normais.

A atividade constitutiva do complexo de transcrição AP-1, induzida pelo antígeno MT do vírus polioma, mostrou-se necessária para tornar estas células transformadas capazes de crescer em meio semi-sólido de agarose, não sendo, porém, essencial para garantir a capacidade proliferativa das mesmas em substrato sólido.

Deste modo, o complexo de transcrição AP-1 desempenha um papel essencial na transformação maligna mediada por MT.

A transformação celular mediada por MT promove uma diminuição significativa da atividade da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMW-PTP). Esta diminuição pode, pelo menos em parte, ser devido ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio produzidos por estas células mediante o processo de transformação celular induzido por este antígeno tumoral.

7) Referências Bibliográficas

- Aaronson SA & Todaro G. Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated *in vitro*. *Science*, 1968, 162: 1024-1026.
- Albanese C, D'Amico M, Reutens AT, Fu M, Watanabe G, Lee RJ, Kitsis RN, Henglein B, Avantaggiati M, Somasundaram K, Thimmapaya B & Pestell RG. Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem.*, 1999, 274: 34186-34195.
- Angel P, Smeal T, Meek J & Karin M. Jun and v-jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol.*, 1989, 1: 35-43.
- Angel P & Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1991, 1072: 129-157.
- Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in control of 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70: 2702-2706.
- Armelin MCS, Armelin HA, Callahan MA, Cochran BR & Stiles CD. New tactics for analysis of oncogenes. In: *Cancer Cells*, 1985, 3: 195-203, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Armelin HA. Peptide growth factors and cell cycle control. *Biomed. Pharm.*, 1990, 44: 103-108.
- Armelin MCS & Oliveira MLS. Polyomavirus-induced malignant transformation: comparative analysis of wild type and mutant middle T-overexpressing cell lines. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1996, 29: 1133-1140.
- Assefa Z, Valius M, Vántus T, Agostinis P, Merlevede W & Vandenheede JR. JNK/SAPK activation by platelet-derived growth factor in A431 cells requires both the phospholipase C- γ and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways of the receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 261: 641-645.
- Auer KL, Contessa J, Brenz-Verca S, Pirola L, Rusconi S, Cooper G, Abo A, Wymann MP, Davis RJ, Birrer M & Dent P. The Ras/Rac1/Cdc42/SEK/JNK/c-Jun cascade is a key pathway by which agonists stimulate DNA synthesis in primary cultures of Rat hepatocytes. *Mol Cell Biol.*, 1998, 9: 561-573.
- Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P & Cantley LC. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell*, 1989, 57: 167-175.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1999. Boston, John Wiley.
- Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB & Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 217-221.

- Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A & Rhee SG. Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 10527-10531.
- Balk SD. Calcium as a regulator of the proliferation of normal but not transformed chicken fibroblast in a plasma-containing medium. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 1971, 68: 271-275.
- Benjamin T & Voght PK. Cell transformation by viruses. In: *Virology* .2nd Ed. Fields B N, Knipe DM, et al., Raven Press, Ltd.: New York, 1990: 317-367.
- Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J.*, 1984, 220: 345-360.
- Berridge MJ & Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 1984, 312: 315-321.
- Berti A, Rigacci S, Raugei G, Degl'Innocenti D & Ramponi G. Inhibition of cellular response to platelet-derived growth factor by low Mr phosphotyrosine protein phosphatase overexpression. *FEBS Lett.*, 1994, 349: 7-12.
- Binétruy B, Smeal T & Karin M. Ha-Ras augments cJun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature*, 1991, 351: 122-127.
- Bjorge JD, Jakymiw A & Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene*. 2000, 19: 5620-5635.
- Blaikie PA, Fournier E, Dilworth SM, Birnbaum D, Borg JP & Margolis B. The role of the Shc phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain and tyrosine phosphorylation sites in polyoma middle T antigen-mediated cell transformation. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 20671-20677.
- Bourne HP, Saunders DA & McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 1990, 348: 125-132.
- Boyle WJ, Smeal T, Defize LHK, Angel P, Woodgett JR, Karin M & Hunter T. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA binding activity. *Cell*, 1991, 64: 573-584.
- Brewster CEP, Glover HR & Dilworth SM. pp60^{c-src} binding to polyomavirus middle T-antigen (MT) requires residues 185 to 210 of the MT sequence. *J. Virol.*, 1997, 71: 5512-5520.
- Broome MA & Hunter T. The PDGF receptor phosphorylates Tyr 138 in the c-Src SH3 domain in vivo reducing peptide ligand binding. *Oncogene*, 1997, 14: 17-34.
- Brown PH, Alani R, Preis LH, Szabo E & Birrer MJ. Suppression of oncogene induced transformation by a deletion mutant c-Jun. *Oncogene*, 1993, 8: 877-886.
- Brown PH, Chen TK & Birrer MJ. Mechanism of action of a dominant-negative mutant of c-Jun. *Oncogene*, 1994, 9: 791-799.
- Bucciantini M, Stefani M, Taddei N, Chiti F, Rigacci S & Ramponi G. Sequence-specific recognition of peptide substrates by the low Mr phosphotyrosine protein phosphatase isoforms. *FEBS Lett.*, 1998, 422: 213-217.

Bucciantini M, Chiarugi P, Cirri P, Taddei L, Stefani M, Raugei G, Nordlund P & Ramponi G. The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131-Tyr132 by Src kinase. *FEBS Lett.*, 1999, 456: 73-78.

Byon JCH, Kenner KA, Kusari AB & Kusari J. Regulation of growth factor-induced signaling by protein-tyrosine-phosphatases. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 1997, 216: 1-20.

Campbell KS, Ogris E, Burke B, Su W, Auger KR, Druker BJ, Schaffhausen BS, Roberts TM & Pallas DC. Polyoma middle tumor antigen interacts with Shc protein via the NPTY (Asn-Pro-Thr-Tyr) motif in middle tumor antigen. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 1994, 91: 6344-6348.

Campbell KS, Auger KR, Hemmings BA, Roberts TM & Pallas DC. Identification of regions in Polyomavirus middle T and small T antigens important for association with protein phosphatase 2A. *J. Virol.*, 1995, 69: 3721-3728.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ & Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 1998, 17: 1395-1413.

Carmichael GG, Schaffhausen BS, Dorsky D, Oliver D & Benjamin TL. Carboxyterminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes, associated protein kinases activities and cell transformation. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 1982, 79: 3579-3583.

Carpenter CL, Duckworth BC, Auger KR, Cohen B, Schaffhausen BS & Cantley LC. Purification and characterization of phosphoinositide-3 kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265: 19704-19711.

Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G & Ramponi G. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 32554-32560.

Cheng SH, Harvey R, Espina PC, Semba K, Yamamoto T, Toyoshima K & Smith AE. Peptides antibodies to the human *c-fyn* gene product demonstrate pp59^{c-fyn} is capable of complex formation with the middle T antigen of Polyomavirus. *EMBO J.*, 1988, 7: 3845-3855.

Chiarugi P, Cirri P, Raugei G, Camici G, Dolfi F, Berti A & Ramponi G. PDGF receptor as a specific in vivo target for low Mr phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Letters*, 1995, 372: 49-53.

Chiarugi P, Cirri P, Marra F, Raugei G, Fiaschi T, Camici G, Manao G, Romanelli RG & Ramponi G. The Src and signal transducers and activators of transcription pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in platelet-derived growth factor signaling. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 6776-6785.

Chiarugi P, Cirri P, Taddei L, Giannoni E, Camici G, Manao G, Raugei G & Ramponi G. The low Mr protein-tyrosine phosphatase is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 4640-4646.

Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A & Blenis J. PDGF- and insulin dependent pp70^{S6K} activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 1994, 370: 71-74.

- Cirri P, Chiarugi P, Taddei L, Raugei G, Camici G, Manao G, & Ramponi G. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase tyrosine phosphorylation by c-Src during platelet-derived growth factor-induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 32522-32527.
- Clarke N, Arenzana N, Hai T, Minden A & Prywes R. Epidermal growth factor induction of the *c-jun* promoter by a Rac pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18: 1065-1073.
- Cohen GB, Ren R & Baltimore D. Modular Binding domains in signal transduction proteins. *Cell*, 1995, 80: 237-248.
- Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA & Hunter T. Try⁵²⁷ is phosphorylated in pp60^{c-Src}: implications for regulation. *Science*, 1986, 231: 1431-1434.
- Cooper GM. *Oncogenes*. 2nded. Jones and Barillet Publishers, Inc. Boston, USA, 1995.
- Costanzi E, Rameh L, Joazeiro C & Armelin MCS. Generation of cell lines to study the role played by oncogenes and anti-oncogenes in cell proliferation control. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1990, 23: 795-799.
- Courtneidge SA & Smith AE. Polyomavirus transforming protein associates with the product of the *c-src* cellular gene. *Nature*, 1983, 303: 435-439.
- Cross M & Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, 1991, 64: 271-280.
- Culleré X, Rose P, Thathamangalam U, Chatterjee A, Mullane KP, Pallas DC, Benjamin TL, Roberts TM & Schaffhausen BS. Serine 257 phosphorylation regulates association of polyomavirus middle-T antigen with 14-3-3 proteins. *J. Virol.*, 1998, 72: 558-563.
- Dahl J, Freund R, Blenis J & Benjamin TL. Studies of partially transforming polyomavirus mutants establish a role for phosphatidylinositol 3-kinase in activation of pp70 S6 kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, 16: 2728-2735.
- DeGroot RP, Auwerx J, Bourouis M & Sassone-Corsi P. Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase 3 and the *Drosophila* kinase shaggy. *Oncogene*, 1992, 7: 841-847.
- Dilworth SM, Brewster CEP, Jones MD, Lanfrancone L, Pelicci G & Pelicci PG. Transformation by Polyomavirus middle T antigen involves the binding and tyrosine phosphorylation of Shc. *Nature*, 1994, 367: 87-90.
- Doherty J & Freund R. Polyomavirus large T antigen overcomes p53 dependent growth arrest. *Oncogene*, 1997, 14: 1923-1931
- Druker BJ, Ling LE, Cohen B, Roberts TM & Schaffhausen BS. A completely transformation-defective point mutant of Polyomavirus middle T antigen which retains full and associated phosphatidylinositol kinase activity. *J. Virol.*, 1990, 64 4454-4461.
- Druker BJ & Roberts TM. Generation of a large library of point mutations in Polyoma middle T antigen. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19: 6855-6861.

- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR & Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 1997, 275: 661-665.
- Dunant NM, Senften M & Ballmer-Hofer K. Polyomavirus middle T antigen associates with the kinase domain of Src-related tyrosine kinases. *J. Virol*, 1996, 70: 1323-1330.
- Eckhart W, Hutchinson MA & Hunter T. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell*, 1979, 18: 925-933.
- Eckhart W. Oncogenes of DNA tumor viruses: Papovavirus. In: *Oncogenes and molecular origins of cancer*, RA Weinberg, Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 223-238.
- Ekman S, Rupp E, Thuresson E, Heldin CH & Rönstrand L. Increased mitogenicity of an $\alpha\beta$ heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding. *Oncogene*, 1999, 18: 2481-2488.
- Escobedo JA, Keating MT, Ives HE & Williams LT. Platelet-derived growth factor receptors expressed by cDNA transfection couple to a diverse group of cellular responses associated with cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 1482-1487.
- Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA & Schlessinger J. Activation of phospholipase C- γ by PI3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.*, 1998, 17: 414-422.
- Farmerie W & Folk WR. Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81: 6919-6923.
- Fantl WJ, Johnson DE & Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62: 453-481.
- Feinberg AP & Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 1984, 137: 266-267.
- Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR & Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol-3 kinase. *Cell*, 1995, 81: 727-736.
- Freund R, Bronson RT & Benjamin TL. Separation of immortalization from tumor induction with polyoma large T mutants that fail to bind the retinoblastoma gene product. *Oncogene*, 1992, 7: 1979-1987.
- Glenn GM & Eckhart W. Transcriptional regulation of early response genes during polyomavirus infection. *J. Virol*, 1990, 64: 2193-2201.
- Glover HR, Brewster CEP & Dilworth SM. Association between *src-kinases* and the polyomavirus oncogene middle-T antigen requires PP2A and a specific sequence motif. *Oncogene*, 1999, 18: 4364-4370.
- Gould KL & Hunter T. Platelet-derived growth factor induces multisite phosphorylation of pp60^{c-src} and increases its protein tyrosine kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8: 3345-3356.

Granjeiro JM, Taga EM & Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An. Acad. Bras. Ci.*, 1997, 69: 451-460.

Greenfield C, Hils I, Waterfield MD, Federwisch W, Wollmer A, Blundell TL & McDonald M. EGF binding induces a conformational change in the external domain of its receptor. *EMBO J.*, 1989, 8: 4115-4124.

Hanks SK, Quinn AM & Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogenic of the catalytic domains. *Science*, 1988, 241: 42-52.

Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P & Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, 1969, 223: 363-368.

Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, Wennström S, Claesson-Welsh L, Evans T, Symons M & Stephens L. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.*, 1995, 5: 393-403.

Heldin CH & Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Phys. Rev.*, 1999, 79: 1283-1316.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A & Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the cJun activation domain. *Genes Dev.*, 1993, 7: 2135-2148.

Hu Q, Klippel A, Muslin AJ, Fantl WJ & Williams LT. Ras dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science*, 1995, 268: 100-102.

Hunter T & Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77: 1311-1315.

Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 1991, 64: 249-270.

Hunter, T. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1998, 353: 583-605.

Jelinek MA & Hassel JA. Reversion of middle T antigen-transformed Rat-2 cells by Krev-1: implications for the role of p21^{c-ras} in polyomavirus-mediated transformation. *Oncogene*, 1992, 7: 1687-1698.

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. Anti-tumor promotion and anti-inflammation: down modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 1990, 62: 1189-1204.

Jones SM & Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene*, 2000, 19: 5558-5567.

Kaech S, Covic L, Wyss A & Ballmer-Hofer K. Association of p60^{c-src} with polyoma virus middle-T antigen abrogating mitosis-specific activation. *Nature*, 1991, 350: 431-433.

Kallunki T, Deng T, Hibi M & Karin M. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*, 1996, 87: 929-939

Kapeller R & Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioassays*, 1994, 16: 565-576.

- Kaplan DR, Whitman M, Schaffhausen BS, Raptis L, Garcea RL, Pallas D, Roberts TM & Cantley L. Phosphatidylinositol metabolism and polyoma mediated transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 3624-3628.
- Kaplan DR, Whitman M, Schaffhausen B, Pallas DC, White M, Cantley L & Roberts TM. Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85kD phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. *Cell*, 1987, 50: 1021-1029.
- Kaplan DR, Pallas DC, Morgan W, Schaffhausen B & Roberts TM. Mechanisms of transformation by polyomavirus middle T antigen. *Bioch. Biophys. Acta*, 1988, 948: 345-364.
- Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J & Evans G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI3K and PKB. *Nature*, 1997, 385: 544-548.
- Kazlauskas A, Kashishian A, Cooper JA & Valius M. GTPase-activating protein and phosphatidylinositol 3-kinase bind to distinct regions of the platelet-derived growth factor receptor β subunit. *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12: 2534-2544.
- Kern FG, Pellegrini S, Cowie A & Basilico C. Regulation of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *J. Virol.*, 1986, 1: 275-285.
- Kim BC, Lee MN, Kim JY, Lee SS, Chang JD, Kim SS, Lee SY & Kim JH. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and Rac in the nuclear signaling by tumor necrosis factor- α in Rat-2 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 24372-24377.
- King KL & Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, 60: 601-617
- Kodimangalam SR, Lorenz U, Shoelson SE & Burakoff SJ. Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with mSos. *Mol. Cell Biol.*, 1995, 15: 593-600.
- Koolman J & Röhm KH. Color Atlas of Biochemistry. Thieme, Stuttgart – New York, 1996.
- Kornbluth S, Sudol M & Hanafusa H. Association of the polyomavirus middle T antigen with c-Yes protein. *Nature*, 1986, 325: 171-173.
- Kypta RM, Goldberg Y, Ulug ET & Courtneidge SA. Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell*, 1990, 62: 481-492.
- Laborda J. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acid Res.*, 1991, 19: 3998.
- Land H, Parada LF & Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblast require at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 1983, 304: 596-602.
- Landschulz WH, Johnson PF & McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, 1988, 240: 1759-1764.
- Latchman DS. Eukaryotic transcription factors. Academic Press Second Edition, 1995. a. DNA sequences and transcription factors. b. Transcription factors and cancer. c. DNA binding by transcription factors.

- Li N, Batzer A, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B & Schlessinger J. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, 1993, 363: 85-88.
- Li M & Garcea RL. Identification of the threonine phosphorylation sites on the polyomavirus major capsid protein VP1: relationship to the activity of middle T antigen. *J. Virol.*, 1994, 68: 320-327.
- Liang TJ, Carmichael GG & Benjamin TL. A polyoma mutant that encodes small T antigen but not middle T antigen demonstrates uncoupling of cell surface and cytoskeletal changes associated with cell transformation. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, 4: 2772-2783.
- Ling LE, Druker BJ, Cantley LC & Roberts TM. Transformation defective mutants of polyomavirus middle T antigen associate with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) but are unable to maintain wild type levels of PI 3-kinase products in intact cells. *J. Virol.*, 1992, 66: 1702-1708.
- Liu P, Ying Y, Ko Y-G & Anderson GW. Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 10299-10303.
- Lo YYC, Wong JMS & Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 15703-15707.
- Marcellus R, Whitfield JF & Raptis L. Polyoma virus middle tumor antigen stimulates membrane-associated protein kinase C at lower levels than required for phosphatidylinositol kinase activation and neoplastic transformation. *Oncogene*, 1991, 6: 1037-1040.
- Martin GS. Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature*, 1970, 227: 1021-1023.
- Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, Dérjard B, Davis RJ, Johnson GL & Karin M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, 1994, 266: 1719-1723.
- Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M & Schlessinger J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblasts growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol Cell Biol.*, 1996, 16: 977-989.
- Morgan WC, Kaplan DR, Pallas DC & Roberts TM. Recombinant Retroviruses that transduce middle T antigen cDNAs derived from Polyomavirus mutants: separation of focus formation and soft agar growth in transformation assays and correlation with kinase activities *in vitro*. *J. Virol.*, 1988, 62: 3407-3414.
- Mori S, Tanaka K, Omura S & Saito Y. Degradation process of ligand-stimulated platelet-derived growth factor β -receptor involves ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 29447-29452.
- Mullane KP, Ratnofsky, M, Culleré X & Schaffhausen B. Signaling from polyomavirus middle T and small T defines different roles for protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18: 7556-7564

Murphy ME & Kehrer JP. Oxidation state of tissue thiol groups and content of protein carbonyl groups in chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochem. J.*, 1989, 260: 359-364.

Noda M, Kitayama H, Sugimoto Y, Okayama H, Bassin RH & Ikawa Y. Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated *ras* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 162-166.

Novak U & Griffin BE. Requirement for the C-terminal region of middle-T antigen in cellular transformation by polyomavirus. *Nucl. Acid. Res.*, 1981, 9: 2055-2073.

Ogris E, Mudrak I, Mak E, Gibson D & Pallas DC. Catalytically inactive protein phosphatase 2A can bind to polyomavirus middle tumor antigen and support complex formation with pp60^{C-src}. *J. Virol.*, 1999, 73: 7390-7398.

Oliveira MLS. Transformação celular pelo antígeno MT ("middle T") do vírus polioma: mapeamento do domínio responsável pela ativação do complexo de transcrição AP-1. [Tese de doutoramento apresentada ao Departamento de Bioquímica, Instituto de Química - USP], 1997.

Oliveira MLS, Roberts TM, Druker BJ & Armelin MCS. Mapping of polyomavirus middle T domain that is responsible for AP-1 activation. *Oncogene*, 1998, 16: 2975-2982.

Oliveira MLS, Brochado SM & Sogayar MC. Mechanisms of cell transformation induced by polyomavirus. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, 32: 861-865.

Pallas DC, Cherington V, Morgan W, DeAnda J, Kaplan D, Schaffhausen B & Roberts TM. Cellular proteins that associate with the middle T and small T antigens of polyomavirus. *J. Virol.*, 1988, 62: 3934-3940.

Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB, Brautigan DL & Roberts TM. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small T antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*, 1990, 60: 167-176.

Pallas DC, Fu H, Haehnel LC, Weller W, Collier RJ & Roberts TM. Association of polyomavirus middle tumor antigen with 14-3-3 proteins. *Science*, 1994, 265: 535-537.

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

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 1989, 246: 603-608.

Pledger WJ, Stiles CD, Antoniades HN & Scher CD. Induction of DNA synthesis in Balb/c 3T3 cells by serum components: reevaluation of the committed to DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74: 4481-4485.

Posner BI, Faure R, Burgess JW, Bevan AP, Lachance D, Zhang-Sun G, Fantus IG, Ng JB, Hall DA, Lum BS & Shaver A. Peroxovanadium compounds. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 4596-4604.

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E & Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 1991, 353: 670-674.

- Pyrzynska B, Mosieniak G & Kaminska B. Changes of the *trans*-activating potential of AP-1 transcription factor during cyclosporin A-induced apoptosis of glioma cells are mediated by phosphorylation and alterations of AP-1 composition. *J. Neurochem.*, 2000, 74: 42-51.
- Rameh LE & Armelin MCS. T antigens role in polyomavirus transformation: *c-myc* but not *cFos* or *cJun* expression is a target for middle T. *Oncogene*, 1991, 6: 1049-1056.
- Rameh LE & Armelin MCS. Downregulation of JE and KC genes by glucocorticoids does not prevent the G0→G1 transition in Balb/3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, 12: 4612-4621.
- Rameh LE, Chen CS, Cantley LC. Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell*, 1995, 83: 821-830.
- Rameh LE, Rhee SG, Spokes K, Kazlauskas A, Cantley LC & Cantley LG. Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase C γ -mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 23750-23757
- Rameh LE & Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 8347-8350.
- Ramponi G & Stefani M. Structural, catalytic, and functional properties of low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997, 29: 279-292.
- Rassoulzadegan M, Cowie A, Glaichenhaus N, Kamen R & Cuzin F. The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature*, 1982, 300: 713-718.
- Rassoulzadegan M, Nagashfar Z, Cowie A, Carr A, Grisoni M, Kamen R & Cuzin F. Expression of large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblasts cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80: 4354-4358.
- Rigacci S, Degl'Innocenti D, Bucciantini M, Cirri P, Berti A & Ramponi G. pp60^{v-src} phosphorylates and activates low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 1278-1281.
- Rigacci S, Marzocchini R, Bucciantini M & Berti A. Different *in vitro* and *in vivo* activity of low Mr phosphotyrosine protein phosphatase on epidermal growth factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 250: 577-581.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD & Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 1994, 370: 527-532.
- Romanelli A, Martin KA, Toker A & Blenis J. p70 S6 kinase is regulated by protein kinase Czeta and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19: 2921-2928.
- Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.*, 1911, 13: 397-411.
- Rupp E, Siegbahn A, Rönstrand L, Wernstedt C, Claesson-Welsh L & Heldin CH. A unique autophosphorylation site in the PDGF α -receptor from a heterodimeric receptor complex. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 255: 29-41.

- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. *Molecular Cloning.-A Laboratory Manual*, 1989. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlegel R & Benjamin TL. Cellular alterations dependent upon the polyomavirus ht-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell*, 1978, 14: 587-599.
- Schlesinger TK, DeMalli KA, Johnson GL & Kazlauskas A. Platelet-derived growth factor-dependent association of the GTPase-activating protein of Ras and Src. *Biochem. J.*, 1999, 344: 519-526.
- Sefton M, Dilworth S & Ballmer-Hofer K. Multimerization of polyomavirus middle-T antigen. *J. Virol.*, 1997, 71: 6990-6995.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, 27: 916-921.
- Sistonen L, Holttä E, Makela TP, Keski-Oja J & Alitalo K. The cellular response to induction of the p21^{c-Ha-Ras} oncoprotein includes stimulation of jun gene expression. *EMBO J.*, 1989, 8: 815-822.
- Smeal T, Angel P, Meek J & Karin M. Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes. *Genes Dev.*, 1989, 3: 2091-2100.
- Sonobe MH, Bravo R & Armelin MCS. Imbalanced expression of cellular nuclear oncogenes caused by v-sis/PDGF-2. *Oncogene*, 1991, 6: 1531-1537.
- Sorkin A, Westermarck B, Heldin CH & Welsh-Claesson L. Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and PDGF β -receptor. *J. Cell. Biol.*, 1991, 112: 469-478.
- Srinivas S, Schönthal A & Eckhart W. Polyomavirus middle sized tumor antigen modulates cJun phosphorylation and transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 10064-10068.
- Su W, Liu W, Schaffhausen BS & Roberts TM. Association of polyomavirus middle tumor antigen with phospholipase C- γ -1. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 12331-12334.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K & Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995, 270: 296-299.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ & Finkel T. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J.*, 1996, 318 :379-82.
- Sun H & Tonks NK. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 1994, 19: 480-485.
- Sutherland C, Leighton IA & Cohen P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.*, 1993, 296: 15-19.
- Taberner L, Evans BN, Tishmack PA, Van Etten RL, Stauffacher CV. The structure of the bovine protein tyrosine phosphatase dimer reveals a potential self-regulation mechanism. *Biochemistry*, 1999, 38: 11651-11658.

- Taylor P, Gilman J, Williams S, Couture C & Mustelin T. Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 5371-5374.
- Thomas JE, Aguzzi A, Sorramo P, Wagner EF & Brugge JS. Induction of tumor formation and cell transformation by polyoma middle T antigen in the absence of src. *Oncogene*, 1993, 8: 2521-2529.
- Todaro GJ & Green H. Quantitative studies of the growth in mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Physiol*, 1963, 17: 299-313.
- Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM & Cantley LC. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5P₃. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 32358-32367
- Ulug ET, Hawkins PT, Hanley MR & Courtneidge SA. Phosphatidylinositol metabolism in cells transformed by polyomavirus middle T antigen. *J. Virol*, 1990, 64: 3895-3904.
- Urich MM, El Shemerly YM, Besser D, Nagamine Y & Ballmer-Hofer K. Activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases by polyomavirus middle-T or serum depend on phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 29286-29292.
- Urich M, Senften M, Shaw PE & Ballmer-Hofer K. A role for the small GTPase Rac in polyomavirus middle-T antigen-mediated activation of the serum response element and in cell transformation. *Oncogene*, 1997, 14: 1235-1241.
- Wang H, Birkenbach M & Hart J. Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 1313-1317.
- Watanabe G, Howe A, Lee RJ, Albanese C, Shu IW, Karnezis AN, Zon L, Kyriakis J, Rundell K & Pestell RG. Induction of *cyclin D1* by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 93: 12861-12866.
- White MF, Shoelson SE, Keutmann H & Kahn CR. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 2969-2980.
- Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L & Roberts TM. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle T competent for transformation. *Nature*, 1985, 315: 239-242.
- Williams LT. Signal Transduction by platelet-derived growth factor receptor. *Science*, 1989, 243: 1564-1570.
- Wisdom R, Johnson RS & Moore C. cJun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 1999, 18: 188-197
- Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ & Harrison SC. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell*, 1999, 3: 629-638.
- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, Fried VA, Ullrich A & Williams LT. Structure of the

receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*, 1986, 323: 226-232.

Zhang X, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR & Avruch J. Normal and oncogenic p21^{ras} proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, 1993, 364: 308-313.

Zheng DQ, Vayssière JL, Petit PX, LeCoeur H, Spatz A, Mignotte B & Feunteun J. Apoptosis is antagonized by large T antigens in the pathway to immortalization by polyomaviruses. *Oncogene*, 1994, 9: 3345-3351.

Zoumpourlis V, Paraskevi P, Linardopoulos S, Gillespie D, Balmain A & Pintzas ^a High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene*, 2000, 19: 4011-4021.

Zullo J, Stiles CD & Garcia RL. Regulation of c-myc and c-fos mRNA levels by polyomavirus: distinct roles for the capsid protein VP1 and the viral early protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84: 1210-1214.