MARI CLEIDE SOGAYAR ARMELIN

INTERAÇÃO ENTRE OS ONCOGENES MYC E FOS NO CONTROLE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ESTUDADA ATRAVÉS DE TRANSFECÇÃO - MEDIADA POR DNA.

Tese de Livre-Docência apresentada ao Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

São Paulo

1987

EM MEMÓRIA

de Evelyn Simão Sogayar
(Dona Elvira)

mãe de sete
inspiradora de muitos.

ÍNDICE

pag.

1.INTRODUÇÃO 1

1.1. Antecedentes históricos e racional metodológico 1

1.2. Oncogenes: elementos subversivos ou controladores naturais 8

1.3. Controle da proliferação celular por fatores de crescimento 12

1.4. Fusão conceitual: oncogenes e fatores de crescimento 20

2.MATERIAL E MÉTODOS 25

2.1. Plasmídios e Bactérias 25

2.2. Linhagens de células 28

2.3. Transfecção de células Balb-3T3 30

2.4. Medidas do crescimento de células 32

2.5. Hormônios e fatores de crescimento 32

2.6. Preparação de plasma 34

2.7. Ensaio de atividade mitogênica 34

2.8. Crescimento de células em suspensão de agarose 35

2.9. Extração e purificação de DNA e RNA de células de mamíferos 35

2.10. Sondas radiativas de DNA 36

2.11. Análise da integração e expressão de oncogenes nos transfectantes 37

2.12. Medidas do potencial tumorogênico de células 39

pag.

3.RESULTADOS 41

3.1. Construção de mutantes de células Balb-3T3 por introdução de oncogenes clonados 41

3.2. Análise de integração e expressão dos oncogenes myc e fos nas linhagens transfectantes 49

3.3. Caracterização dos transfectantes 60

3.3.1. Características morfológicas 60

3.3.2. Crescimento dos transfectantes em substrato sólido: efeito de hormônios e fatores de crescimento 62

3.3.3. Crescimento em suspensão de agarose: efeito de hormônios e fatores de crescimento 71

3.3.4. Medidas do potencial tumorogênico dos transfectantes 73

4.DISCUSSÃO 75

SUMÁRIO E CONCLUSÕES 85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

ABREVIATURAS

EGF: "epidermal growth factor"

FGF: "fibroblast growth factor"

IGF: "insulin-like growth factor"

PDGF: "platelet-derived growth factor"

TGF: "transforming growth factor"

EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético

FCS: soro fetal bovino

DME: "Dulbecco's modified Eagles's medium"

HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperazine-N'-s- etanosulfônico

PBS "phosphate-buffered saline"

TE: tampáo Tris-Cl (pH 7,5) contendo EDTA

TBE: tampão Tris-borato (pH 8,3) contendo EDTA

G0, G1, S, G2, M : fases do ciclo celular

T_D : tempo de dobramento da população

D_S : densidade de saturação

TCA: ácido tricloroacético

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antecedentes Históricos e Racional Metodológico

A possibilidade de introduzir DNA exógeno em células de mamíferos surgiu no início da década de 60 quando Szybalska & Szybaski (1962) conseguiram transformar células humanas mutantes $HPRT^-$ por transferência de gene para hipoxantina-guanina fosforibosil transferase. As condições experimentais que permitiram o sucesso desta transferência não estavam bem definidas o que levou à uma década de tentativas frustradas e resultados não reprodutíveis. Em 1973, Graham & van der Eb descobriram, empiricamente, que DNA de adenovirus, coprecipitado com fosfato de cálcio, era ingerido pelas células chegando, eventualmente, ao núcleo onde se integrava ao genoma celular transformando-as. Só então foi possível constatar que o "meio de transformação" de Szybalska & Szybalski envolvia a formação de precipitado de fosfato de cálcio.

Diversas variações do método de coprecipitação de Graham van der Eb surgiram desde então, principalmente no sentido de permeabilizar a membrana celular (usando glicerol, dimetilsulfóxido, polietilenoglicol, etc) para otimizar a eficiência do processo.

Cêrca de uma década depois, este método foi utilizado por alguns laboratórios para isolar sequências gênicas presentes em tecido tumoral, capazes de causar transformação maligna (Pulciani et al, 1982; Krontiris & Cooper, 1981; Shih &

Weinberg, 1982; Goldfarb et al, 1982). O ensaio destes autores consistia em utilizar a linhagem NIH-3T3 como célula-teste. Supostamente esta seria uma linhagem "normal" cujo crescimento é dependente de soro (como fonte de fatores de crescimento) e substrato sólido (para ancoragem) e é regulada pela densidade celular (a cultura entraria em fase estacionária ao formar uma monocamada de células confluentes). A modificação desta linhagem por sequências tumorais oncogênicas, resultaria na formação de focos de células transformadas que crescem umas sobre as outras, empilhando e se destacando claramente da monocamada formada pelas células originais. O isolamento e propagação destes focos, aliados à tecnologia de DNA recombinante já disponível na época, permitiram a clonagem molecular de uma sequência de DNA capaz de causar transformação de células NIH-3T3 em cultura e tumorogênese no animal (Krontiris & Cooper, 1981; Goldfarb et al 1982; Pulciani et al, 1982; Shih & Weinberg, 1982).

No final da década de 70 já havia sido identificada uma sequência celular (c-src) homóloga à sequência encontrada no retrovirus RSV (v-src) cujo produto ($pp60^{src}$) foi associado à origem do sarcoma causado por este virus (Brugge et al, 1979). Mais tarde foi demonstrado que v-src nada mais era do que c-src recombinado com e transduzido por um retrovirus de ação retardada (Duesberg & Vogt, 1973 ; Martin & Duesberg, 1972; Lai et al, 1973).

Foi, portanto, decorrência natural buscar em retrovirus, possíveis homologias com a sequência determinada para

o fragmento (pEJ 6.6 kb) clonado à partir de DNA proveniente de tumor de bexiga humano. O homólogo viral (v-ras) foi encontrado em Ha-MSV (Der et al, 1982; Parada et al, 1982). Outros autores (Reddy et al, 1982; Tabin et al, 1982) demonstraram também que a sequência proveniente do tumor (EJ-c-ras) diferia da sequência encontrada em todas as células normais (c-ras) em apenas um ponto levando à substituição de uma glicina por valina.

Por volta de 30 sequências celulares (genericamente chamadas (c-onc) dos oncogenes virais (v-onc) já foram identificadas (Bishop, 1985).

A identificação e clonagem de oncogenes ativos em tumores naturais baseava-se exclusivamente no ensaio de foco que usava células NIH-3T3 como indicadoras. Tentativas de utilizar outras células como linhagens indicadoras não estavam sendo bem sucedidas por razões ignoradas: ou o DNA exógeno simplesmente não se integrava ou integrava, era expresso mas não transformava porque a transformação dependia de outros produtos celulares. Comparando diversas células o grupo de Weinberg elegeu NIH-3T3 por serem particularmente eficientes na tomada e integração de DNA exógeno (Smotkin et al, 1975). Mas as células NlH-3T3 são metaestáveis ou pré-neoplásicas, ou seja, têm grande tendência a sofrer uma chamada transformação espontânea. Se isto facilita a detecção da atividade oncogênica de DNA exógeno, também introduz dificuldades técnicas como distinguir focos provocados pela expressão do DNA exógeno daqueles focos

resultantes de empilhamento das células espontaneamente transformadas. Muito mais importante do que isto, porém, é que o ensaio de NIH só permite detectar um fenótipo extremo, a transformação maligna. Outros possíveis efeitos da expressão de sequência exógenas, como por exemplo, aparecimento de células independentes de fatores do soro porém que mantém a resposta a densidade, não poderiam ser detectadas com este ensaio. Além disso os dados mostravam que apenas cerca de 15% dos tumores naturais davam resultados positivos no ensaio da NlH-3T3 e na maior parte destes o gene tranformante era identificado como sendo oncogene ras.

Cotransfecção de um marcador genético com o gene de interêsse havia sido desenvolvido para células mutantes TK^- humanas e de camundongo (Bacchetti et al, 1977; Wigler et al, 1977). Expressão de β globina após cotransfecção de plasmídios contendo o gene para globina e para TK foi demonstrada (Wigler et al, 1979). Southern & Berg (1982) desenvolveram vetores de expressão para células de mamíferos, contendo, além dos sinais regulatórios, um gene que confere resistência a alguma droga, por exemplo: o transposon Tn5 que confere resistência a geneticina G418; gpt: guanina fosforibosil transferase que permite resistência a ácido micólico ou dhfr: dihidrofolato redutase para resistência a tioguanina (metotrexato). A grande vantagem destes vetores é que dispensam a necessidade de células mutantes, permitindo, portanto cotransfecção de qualquer tipo celular e, após seleção com a droga adequada, isolar colônias resistentes à

droga, mas que podem ter integrado e estar expressando também o gene de interêsse.

Nesta época (1982) um pequeno número de laboratórios (o nosso, inclusive) começou a trabalhar com a idéia de que produtos de oncogenes deveriam estar no mecanismo de ação dos fatores de crescimento, atuando como receptores, transdutores de sinais, efetuadores, etc. Passamos então a utilizar a linhagem Balb-3T3 e um marcador genético (HSV-neo) para estudar o papel de proteínas oncogênicas na ação de fatores de crescimento. Basicamente nossa meta era mutar Balb-3T3 com oncogenes clonados através de transfecção-mediada por DNA e verificar de que maneira o produto deste gene afetava a resposta da célula a fatores de crescimento. A substituição de NIH-3T3 por Balb-3T3 foi baseada em 2 pontos importantes: a) as linhagens disponíveis de Balb-3T3 têm comportamento mais próximo de células normais e têm menor tendência a transformação espontânea; b) ao contrário de NIH-3T3 que provém de camundongo suíço "outbred", Balb-3T3 foi isolada de camundongos isogênicos ("inbred") Balb-c, o que permite não só analisar o efeito de oncogenes em "background" genético homogêneo, como também realizar ensaios de tumorogenicidade sem precisar recorrer a animais imunodeprimidos (como é o caso para células NIH-3T3).

A confirmação de que produtos de oncogenes estão ligados a ação dos fatores de crescimento veio com a revelação surpreendente e impactante de que o produto do oncogene v-sis é homologo à cadeia B de PDGF (Doolitle et al, 1983; Waterfield

et al, 1983). O impacto foi devido a oferecer uma explicação, ao nível molecular, para a autonomia de crescimento dos tumores causados por SSV (o vírus de sarcoma de símios) isto é, o oncogene v-sis deste vírus codificaria para um fator de crescimento (PDGF) o qual atuaria nos receptores específicos presentes nestas células, criando, assim, um curto-circuito no controle da proliferação ou seja, um controle autócrino-hipótese formulada alguns anos antes pelo grupo de Todaro (Todaro e DeLarco, 1978; Sporn & Todaro, 1980).

Logo em seguida foi demonstrado que o protooncogene c-myc era um dos genes induzíveis por PDGF (Kelly et al, 1983).

Para atacar diretamente o problema da relação entre oncogenes e fatores de crescimento, usamos uma construção na qual o c-myc de camundongo está sob a ação de um promotor viral induzível (MMTV) e desenhamos um novo tipo de ensaio baseado em dupla seleção (tratamento com G418 em meio livre de PDGF) (Armelin et al, 1984). Neste trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que o produto de um oncogene (c-myc) funciona como mediador intracelular do produto de outro oncogene (c-sis) ou seja, de PDGF. Com o novo ensaio, de dupla seleção, foi possível também introduzir uma modificação conceitual - a expressão constitutiva de oncogenes pode levar a eliminação total ou parcial do requerimento para fatores de crescimento sem , necessariamente, provocar transformação maligna. Dispondo de um ensaio adequado é possível então identificar os fatores

controladores da proliferação. Com este ensaio surgiu também uma alternativa para a detecção de novos oncogenes em tecido tumoral, aproveitada aliás por Cooper e cols para confirmar a existência do oncogene B-lym (Cooper et al, 1986).

O racional que norteia este trabalho é o seguinte: se a alta expressão de um oncogene (obtida por transfecção de construções devidamente dotadas de promotores fortes e/ou moduláveis) levar à independência de um fator de crescimento normalmente requerido por esta célula, o produto deste oncogene pode ser um dos componentes da via de ação deste fator, a qual se encarrega de transduzir o sinal mitogênico do receptor na membrana até o núcleo (ou outros sítios celulares) onde o sinal seria decodificado.

Para a célula Balb-3T3 (usada como paradigma de célula normal) sair do estado de repouso (G0) para entrar no ciclo celular, ocorrem dois tipos de fatores (Stiles et al, 1979):fatores de "competência" (FGF, PDGF) e de "progressão" (EGF e IGF) conforme discutido mais adiante. O enfoque experimental visa mapear as proteínas oncogênicas nas vias de ação destes dois tipos de fatores. O trabalho descrito nesta tese foi realizado nos últimos dois anos e visa compreender a interação entre os produtos dos oncogenes myc e fos e o papel destes produtos no mecanismo de ação dos fatores de competência (FGF, PDGF) no "background" metabólico das células Balb-3T3.

Alguns dos pontos levantados aqui serão desenvolvidos nas seções seguintes desta Introdução e na Discussão.

1.2. Oncogenes: Elementos subversivos ou controladores naturais?

Oncogenes (ver revisões de Bishop 1978, 1981, 1983, 1985 ; Duesberg, 1983 e Weiss et al, 1982) foram inicialmente detectados em vírus de RNA causadores de tumor em animais de laboratório.

A história desta descoberta (Tooze & Sambrook, 1974) que tem aspectos fascinantes e pitorescos, aponta Rous como o fundador da Virologia Tumoral por ter sido o primeiro a mostrar que extratos filtrados de sarcoma de galinha induzem sarcoma em animais sãos (Rous, 1911). Enquanto Shope (1933),trabalhando no Jackson Memorial Laboratory, tentava isolar o virus causador de tumores de coelhos selvagens, o pessoal técnico do biotério chamou atenção para o fato de estar ocorrendo uma transmissão de carcinoma de mama, em linhagens de camundongo, de uma geração para outra. Isto levou Bitter (1942) a procurar no leite materno a possível fonte de um agente viral e à descoberta do fator de Bitter ou retrovírus do tipo B. Enquanto isto Gross procurava o vírus da leucemia (tipo C), atingindo seu objetivo em 1950. Em 1958, Temin & Rubin abriram novas pespectivas para o campo com a introdução de um ensaio "in vitro" para o vírus tumoral RSV baseado na capacidade deste vírus de induzir "transformação" das células e formação de focos. Ao infectar ratos com vírus de leucemia isolado de camundongos, Harvey (1970) acabou induzindo a formação de sarcomas e isolando um vírus de sarcoma destes animais (Ha-MSV; Harvey murine sarcoma vírus). Os diversos

retrovírus do tipo C isolados desde então se agrupam em duas categorias: aqueles que são capazes de transformar células em cultura (formação de focos) e induzir a formação de tumor rapidamente quando injetados em animais (vírus do tipo sarcoma) e vírus de efeito mais tardio (leucemias) para os quais um ensaio "in vitro" só foi desenhado mais recentemente (Scher & Siegler, 1975). O exame do genoma destes vírus mostra que os dois tipos de vírus têm sequências em comum (gag, pol, env) relacionadas com a estrutura e a propagação da partícula viral e sequências que só estão presentes nos vírus de sarcoma. Graças a um mutante de RSV com alteração exatamente nesta sequência diferente (Martin, 1970) foi possível mostrar que esta sequência é responsável pela indução dos sarcomas. Foi por isso designada v-src, o gene viral causador de sarcomas, o primeiro oncogene identificado. A existência de oncogenes em vírus era muito intrigante uma vez que seus produtos não têm nada a ver nem com a sobrevivência nem com a propagação da partícula viral, portanto, não conferem nenhuma vantagem seletiva ao vírus. A resposta a este mistério surgiu quando foi descoberto, em células de mamíferos, uma sequência (celular) homóloga ao v-src de RSV, designada c-src para diferenciar da sequência viral (Brugge & Erickson, 1977). Diversas sequências celulares (c-onc) homólogas aos oncogenes virais (v-onc) foram então identificadas levando à hipótese unificadora e esclarecedora de que os retrovírus nada mais são do que transdutores de protooncogenes celulares (Bishop, 1983; Duesberg, 1983).

A baixa frequência de retrovírus contendo c-oncs pôde então ser explicada: o aparecimento deles dependeria de dois eventos raros: a) recombinação entre sequências de c-onc com sequências virais não relacionadas com c-onc; b) mutações que levam um protooncogene celular a v-onc, uma vez que importantes diferenças tanto estruturais como funcionais são encontradas entre c-onc e v-onc. Portanto, os oncogenes virais são os próprios oncogenes celulares (protooncogenes) que foram incorporados ao genoma viral por recombinação dos retrovírus de infecção lenta (causadores de leucemias) com o genoma celular (Bishop & Varmus, 1982). Desta forma o v-onc difere de c-onc por: a) estar incorporado a um genoma viral e, portanto, sob o controle transcripcional de ativadores ("enhancers") virais; b) apresentar a sequência codificante num segmento contínuo de DNA, enquanto nos protooncogenes a sequência codificante é entremeada de regiões não codificantes (introns); c) acumular mutações que podem levar à aquisição de maior potencial oncogênico.

As técnicas modernas de DNA recombinante aliadas à transfecção-mediada por DNA, permitiram isolar até agora cêrca de 30 oncogenes, a maioria dos quais representado tanto em retrovírus como no genoma celular. Uma proposta de nomenclatura (Coffin et al, 1981) foi imediatamente adotada para v e c-oncs.

Os produtos de alguns oncogenes virais e celulares já estão identificados; é comum o produto de v-oncs aparecer como uma proteína de fusão com o produto do gene gag ou outro gene viral (como é o caso para $p110^{gag-myc}$ do vírus MC 29, $p200^{gag-pol-myc}$ de OK10 ou $p120^{gag-abl}$ de A-MLV). Várias pro-

teínas oncogênicas aparecem fosforiladas (pp 60^{src} ; pp54^{c-myc} ; pp52^{c-fos}). Algumas proteínas oncogênicas podem ser encontradas no meio extracelular (sis), outras na membrana plasmática (abl, erb B, fes, fms), do lado de dentro da membrana (src, ras), no citoplasma (sis, erb A, mos, mil/raf) e no núcleo (myc, fos, myb, ets, ski). Esta ubiquidade é uma forte evidência de que estas proteínas desempenham papel essencial na célula.

Apesar desta diversidade, o estudo da função das proteínas oncogênicas aponta para uma idéia unificadora: são componentes do sistema de transdução e decodificação da informação química contida nos fatores de crescimento e hormônios envolvidos na regulação da proliferação celular (Stiles, 1983).

O primeiro produto oncogênico para o qual se encontrou uma possível função na célula é pp60^{src} (Collet & Erickson, 1978). Foi descoberto que esta proteína tem atividade de tirosina-quinase, fosforilando a si mesma e uma série de substratos celulares (Hunter & Cooper, 1985). Só que até mesmo o exame minucioso e refinado dos substratos fosforilados não iluminou o quadro onde se coloca a questão crucial: o que leva uma célula normal à neoplasia? Aos produtos de localização nuclear tem sido atribuído papel de proteínas ligantes de DNA e reguladoras da transcrição (Kingston et al, 1985). A análise comparativa mostrou que p21^{ras} é análoga a proteínas G reguladoras da atividade de adenil ciclase (Hurley et al, 1984; Tamanoi et al, 1984). Uma importante diferença entre a proteína normal

e a mutada (tumoral) é na atividade de GTPase associada apenas à primeira (Sweet et al, 1984; Gibbs et al, 1984) o que permitiu avançar um modelo de neoplasia baseado num curto-circuito em analogia ao mecanismo de regulação da adenil ciclase ($p21^{ras}$ ficaria permanentemente ativada pela ligação contínua de GTP).

A descoberta de que $pp60^{src}$ tem atividade de tirosina- quinase, associada aos dados de que alguns fatores de crescimento (EGF, PDGF) ativam uma tirosina quinase presente nos seus respectivos receptores, permitiram visualizar outro mecanismo para o surgimento do estado neoplásico: uma permanente ligação de receptores que normalmente só são acionados por fatores regulatórios do crescimento (Heldin & Westermark, 1984; Downward et al, 1984).

1.3. Controle da proliferação celular por fatores de crescimento

A proliferação celular é diferencialmente controlada "in vivo", uma vez que alguns tecidos têm alta taxa de renovação (epitélio do revestimento das cristas intestinais) enquanto em outros o índice mitótico é baixíssimo (hepatócitos, córtex adrenal) ou nulo (neurônio). Em uns poucos casos foi possível identificar o estímulo que leva à proliferação dos tecidos (hepatectomia parcial que leva os hepatócitos a uma onda sincrônica de síntese de DNA e divisão celular) mas, na sua maior parte, os sinais que operam "in vivo" eram, até muito recentemen-

te, inteiramente desconhecidos. A cultura de células "in vitro" ofereceu um modelo experimental para atacar o problema de controle da proliferação celular. O sistema envolveu, desde o início, a combinação de uma superfície sólida, para ancoragem das células, com um meio de cultura consistindo de uma parte quimicamente definida (nutrientes, sais) e outra complexa e indefinida como soro de animais. Foi postulado (Armelin, 1975) que soro é a fonte de sinalização da proliferação, uma vez que a presença de soro no meio é um requerimento absoluto para a divisão das células. Ao contrário de células normais que requerem alta concentração (10%) de soro e, portanto, de fatores de crescimento no meio de cultura, células transformadas crescem muito bem em concentrações 10-20 vezes menor de soro, sendo, portanto, mais independentes de sinais extracelulares (Todaro et al, 1965; Armelin 1973; Holley & Kiernam 1974; Pledger et al 1977). Dois aspectos têm sido focalizados em vários laboratórios inclusive o nosso: a) como se compõe, organiza e atua o (s) sistema (s) de controle de células normais; b) como é este sistema de controle subvertido por agentes causadores da transformação maligna.

Tentativa de purificar estes sinalizadores de proliferação à partir de soro foram inteiramente infrutíferas (Lipton et al, 1971). Com a introdução de um ensaio adequado foi possível demonstrar que a hipófise é uma fonte de fatores de crescimento atuante em fibroblastos 3T3 (Armelin, 1973). A base deste ensaio (carenciar a cultura para soro e, em seguida, analisar a entrada em S desencadeada por frações hipofisárias) permitiu o isolamento e purificação não só de FGF ("fibroblast

growth factor") como também de PDGF ("platelet-derived growth factor"), IGF ("Insulin-like growth factor"), etc. EGF ("epidermal growth factor") isolado na década de 60 (Cohen, 1962) como um peptídeo que acelerava a abertura de olho de camundongos recém-nascidos, foi também identificado como um sinalizador importante da proliferação (Armelin, 1973).

Desde sua descoberta (Armelin, 1973) FGF foi purificado de hipófise e de cérebro (onde pode ser que seja armazenado) mas, pode ser encontrado em diversos tecidos mesodermais, havendo indicações de que pode ser sintetizado por diversos tipos de células (Armelin, 1973; Armelin et al, 1977; Gambarini et al, 1979; Thomas, 1980; Gospodarowicz et al, 1984, 1985, 1986; Baird et al, 1985 a, b, c; Nishi et al, 1985).

FGF compreende uma família de peptídeos básicos e ácidos (para revisões ver Thomas & Gimenez-Gallego, 1986; Gaspodarowicz, et al, 1986). FGF básico foi purificado de hipófise e cérebro pelo grupo de Gospodarowicz (1975, 1978). FGF ácido foi descrito e purificado de hipófise (Gambarini & Armelin, 1979; 1982) e de cérebro (Thomas, 1980), Mas só recentemente foi possível obter preparações suficientemente homogêneas para permitir o sequenciamento de dois protótipos de FGF: um básico de 146 aminoácidos (Gimenez-Gallego et al, 1985) e um ácido de 140 aminoácidos (Esch et al, 1985; Bohlen et al, 1985). Estudos de receptores específicos de FGF foram desencadeados recentemente (Neufeld & Gospodarowicz, 1985; 1986). Mais de 10 fatores de crescimento isolados de diferentes tecidos, com atividade mitogênica para certos tipos celulares descritos como entidades

químicas diferentes dos fatores peptídicos existentes, foram recentemente identificados como membros da familia de FGFs (Thomas & Gimenez-Gallego, 1986; Gospodorowicz et al,1986).

O estudo de FGF sofreu um grande avanço com a obtenção de anticorpos contra estes peptídeos e a montagem de um radioimunoensaio (Bohlen et al, 1984).

Efeitos de FGF tem sido descritos tanto para células em cultura como para sistemas "in vivo". A ação de FGF não se restringe a fibroblastos atingindo uma gama variada de tipos celulares todos de origem mesenquimal. Desde a descrição de FGF como fator mitogênico para células 3T3 suiças (Armelin, 1973), sua atividade promotora de proliferação foi demonstrada para células corticoadrenais, células de glioma de rato e diversos outros tipos celulares de origem mesodermal incluindo células endoteliais, macrófagos, mioblastos, células de músculo liso de vasos, etc. (revisto por Gospodarowicz et al, 1986). Uma atividade mitogênica que leva a contrabalançar a senescência precoce de células endoteliais de córnea foi descrita por Gospodarowicz et al, 1981). A exata relevância deste potencial mitogênico demonstrado em cultura, para processos biológicos que ocorrem nos organismos não está bem definida. Indicações de que FGF pode ter papel importante em processos de reparo de lesões e morfogênese em diversos tipos de tecidos e orgãos, são dadas pela seguintes evidências:a) FGF promove a regeneração de extremidades em anfibios (Gospodarowicz & Mescher, 1981); b) FGF é um dos agentes angiogênicos mais potentes até agora conhecidos (Thomas et al, 1985) isto é, induz o crescimento de capilares sanguí-

neos, promovendo, assim, a vascularização de tecidos; c) FGF induz diferenciação das células cromafínicas PC12 mimetizando NGF ("nerve growth factor") (Togari et al, 1985; Wagner & D'Amore, 1986).

A ação de FGF a nível celular e molecular é do tipo pleiotípica, como também ocorre com PDGF e EGF. Assim, rapidamente, FGF causa alterações morfológicas, rearranjos do citoesqueleto, aumento da síntese protéica e de RNA, indução da expressão de genes específicos, etc. A multiplicidade e complexidade destes efeitos torna difícil distinguir e estudar as etapas primárias da ação destes fatores. Acredita-se que a indução dos protooncogenes c-myc e c-fos por FGF e PDGF, recentemente descoberta (Kelly et al, 1983; Kruijer et al, 1984; Müller et al, 1984) tenha papel primordial na ação destes fatores; esta hipótese é objeto de estudo nesta tese.

Enfim, a ubiquidade e o alto grau de conservação do gene para FGF (dificultando durante tantos anos o desenvolvimento de um antisoro contra este peptídeo) sugerem um papel primordial no desenvolvimento, crescimento e diferenciação do individuo. A recente clonagem e sequenciamento do gene para FGF (Abraham et al, 1986 a e b; Jaye et al, 1986) prometem grandes avanços no campo para o futuro próximo.

PDGF é um fator peptídico catiônico (pI 10,5) de 30 kd composto por 2 cadeias polipeptídicas (A e B), ligadas por inúmeras pontes S-S (Heldin et al, 1979) as quais são essenciais para sua atividade (Johnsson et al 1982, 1984) e armazenado em plaquetas. Foi purificado até homogeneidade

eletroforética por 2 laboratórios, um americano e outro sueco (Antoniades et al, 1979; Heldin et al, 1979) à partir de plaquetas humanas. Recentemente o gene que codifica para PDGF foi sequenciado (Devare et al, 1983). Diversos tipos de células sintetizam PDGF mas o armazenamento é feito em plaquetas. PDGF não é encontrado na circulação; na verdade , quando injetado em macacos, desaparece da circulação em poucos minutos (Bowen-Pope et al, 1984). PDGF só é liberado das plaquetas quando o sangue coagula (por ação de trombina ou outros agentes). Admite-se então que a ação de PDGF (e de FGF também) seja mais do tipo parácrina ou autócrina e não endócrina como é o caso para os hormônios clássicos.

Não está claro ainda qual a forma nativa de PDGF: tanto heterodímero como homodímero de cadeia A ou de cadeia B, tem sido descritos para as diferentes preparações (Johnsson et al, 1984; Stroobant & Waterfield, 1984; Heldin et al, 1986). Existe a possibilidade de que a microheterogeneidade das preparações e mesmo a composição de subunidades sejam influenciadas pelos métodos de extração e purificação. Ao contrário de FGF que é extremamente lábil, PDGF é resistente a uma série de agentes físicos (calor) e químicos (ácido, uréia, SDS). Se isto facilita sua purificação, a natureza básica de PDGF e sua tendência a aderir a todo tipo de superfície, muito dificultam tanto a purificacão como o estudo deste fator.

Diversos tipos de células normais e transformadas (tumorais) secretam PDGF ou moléculas semelhantes a PDGF estrutural e funcionalmente (revisto em Ross et al, 1986). Entre as

células normais encontram-se plaquetas (megacariócitos), macrófagos, células endoteliais, músculo liso e placenta. Fator tipo PDGF que é inclusive neutralizado com anticorpo contra PDGF é secretado por células transformadas pelo virus de DNA SV40 (Dicker et al, 1981; Bowen-Pope et al, 1984; Stroobant et al, 1985) e por retrovírus de sarcoma de símios, SSV (Leal et al, 1985) este último caso é fácil de compreender uma vez que a proteína transformante de SSV, $p28^{sis}$, é homóloga a PDGF (Doolittle et al, 1983; Waterfield et al, 1983). Secreção de um fator tipo PDGF já foi descrito para osteosarcomas (Heldin et al, 1980; Betsholtz et al, 1984) e gliomas humano (Betsholtz et al, 1983; Nister et al, 1984). O possível papel da secreção deste fator para o fenótipo tumoral com a formação de um circuito autócrino oferece uma explicação para a origem destas neoplasias. Um complicador deste modelo é a produção de moléculas semelhantes a PDGF por tumores de células que não são responsivas a este fator como neuroblastoma, carcinoma de bexiga e hepatomas (van Zoelen, 1985; Bowen-Pope et al, 1984; Niman et al, 1984). A disponibilidade de preparações bastante puras já permitiu estudos do receptor de PDGF. Somente células mesodermais (que respondem a PDGF) ligam PDGF iodinado com Kd entre 10^{-9} e 10^{-11} M (Heldin et al, 1981; Huang et al, 1981). O receptor de PDGF é uma proteína de membrana de cerca de 180 Kd (Glenn et al, 1982; Heldin et al 1983) cujos resíduos de tirosina são fosforilados (autofosforilação?) por ligação de PDGF (EK et al, 1982; Nishimura et al, 1982; Cooper et al, 1982).

Além de seu efeito mitogênico direto, PDGF age também indiretamente estimulando a eritropoiese (Dainiak et al, 1983) e a resposta de certas células T apresentadoras de antígenos (Acres et al,1985). Ativa também a secreção de outros fatores de crescimento (Clemmons et al, 1981). É um vasoconstritor ainda mais potente que angiotensina II (Berk et al, 1986) e funciona como quimioatraente para células em cultura (Grotendorst et al, 1982; Seppã et al, 1982).

Como FGF, PDGF também tem efeito pleiotípico. Entre os efeitos mais imediatos de PDGF encontram-se a fosforilação de resíduos de tirosina do seu receptor (EK et al, 1982; Cooper et al, 1982; Nishimura et al, 1982); alterações morfológicas devido a pertubações do citoesqueleto (Bockus & Stiles, 1983); estimulação do metabolismo de fosfatidilinositol (Habenicht et al, 1981, Berridge & Irvine, 1984); alterações do transporte iônico (Laat el al 1985) e aumento da incorporação de precursores da síntese proteica e de RNA (Cockran et al, 1981; Stiles, 1983). A transcrição de alguns genes é especificamente induzida por PDGF (e fatores tipo PDGF como FGF) entre eles destacam-se os protooncogenes c-myc (Kelly et al, 1983) e c-fos (Müller et al, 1984; Kruijer et al, 1984; Cockran et al, 1984; Greenberg & Ziff, 1984).

Efeitos mais tardios da ação de PDGF foram recentemente descritos (Zullo et al, 1985). Estes autores mostraram a indução de interferon e da enzima 2,5 oligonucleotídio sintetase após cêrca de 8 horas do tratamento com PDGF. Este achado permitiu a formulação de um modelo para ação deste fator

onde os genes precocemente induzidos (fos, myc e outros) seriam desligados pelos genes tardios (β-interferon) num "loop" auto-regulatório.

1.4. Fusão conceitual: oncogenes e fatores de crescimento

A ação de fatores como FGF e PDGF levam células Balb-3T3 que estão em repouso (G0), a se comprometer com um programa de transcrição que culmina com a divisão celular. Uma sequência ordenada de eventos (Pledger et al, 1977; Stiles et al, 1979) ocorre dependendo da presença de dois tipos de controladores representados por PDGF (presente no soro mas não no plasma) e somatomedinas, atualmente chamados IGFs ("insulin-like growth factors") presentes tanto no soro como no plasma. O primeiro "sensibiliza" as células tornando-as "competentes" para a divisão que só ocorrerá se os segundos (chamados fatores de progressão) forem fornecidos. A meia vida do estado de competência foi determinada como sendo de 18-20h (Singh et al, 1983; Stiles, 1983) sugerindo a participação de mensageiros estáveis, hipótese confirmada elegantemente por Smith & Stiles (1981) por fusão celular e corroborada por microinjeção de mRNA purificado (Armelin et al, 1985) mostrando que a "memória de competência" é dada por alguns mensageiros relativamente estáveis.

A hipótese de "competência - progressão" (Pledger et al 1977; Stiles et al, 1979), permite visualizar FGF e PDGF

como fatores que retiram as células de G0 colocando-as na trilha do ciclo celular (início de G1) enquanto EGF e IGFs atuariam, respectivamente na primeira e segunda metades de G1 levando as células até um ponto, sem retorno, de comprometimento total com a síntese de DNA (S) e divisão celular (M) (Pardee, 1974; Yen & Pardee, 1978). Este modelo de controle da proliferação celular por fatores de competência e de progressão não se aplica apenas a células 3T3 , é encontrado também para fibroblastos humanos (Bright & Gaffney, 1982) e para outros sistemas como linfócitos (Milner, 1977; Larsson & Coutinho, 1979) indicando que os mecanismos de controle da proliferação podem ser comuns a diversos tipos celulares. Propriedades em comum, ao nível molecular, foram de fato encontradas mais recentemente (ver: indução de protooncogenes myc e fos por fatores de competência para fibroblastos e para linfócitos, discutido mais adiante).

O mecanismo de ação de fatores de competência (FGF, PDGF) a nível molecular, começou a ser desvendado em 1983. O grupo de Stiles clonou sequências (c-DNAs) que são especificamente induzidas por PDGF designando-as KC, JE, JB, etc (Cochran et al, 1983). Pledger et al (1981) havia descrito um grupo de proteínas especificamente induzidas por PDGF. Era razoável supor que estes produtos, detectados em gel bidimensional após marcação metabólica com metionina S^{35}, por Pledger et al, (1981) eram codificados pelos genes induzíveis por PDGF mas não se dispunha de dados concretos para afirmar isto. Tornou-se claro porém que PDGF, um regulador extracelular, induzia a expressão de uns poucos genes cujos produtos poderiam ser os equivalentes

intracelulares de PDGF (2os. mensageiros). Outras informações pertinentes, disponíveis na literatura, mostravam que: a) células transformadas perdem o requerimento para PDGF (Balk, 1971; Scher et al, 1978); b) diversos tumores produzem um fator de crescimento homólogo a PDGF estrutural e funcionalmente sugerindo como causa do crescimento anômalo um tipo de controle autócrino, hipótese formulada inicialmente por Todaro e De Larco (1978). Este conjunto de dados levaram Stiles (1983) a antecipar o papel de produtos dos oncogenes virais e celulares na cascata de eventos que começa com a interação fator-receptor e termina com a divisão celular.

A primeira confirmação desta hipótese lançada por Stiles (1983) veio com a revelação de que a sequência de aminoácidos de PDGF (Devare et al, 1983) é homóloga à sequência encontrada para p28^{v-sis}, o produto do oncogene v-sis de virus de sarcoma de simios, SSV (Doolittle et al, 1983; Waterfield et al, 1983). E outros dados se seguiram: o receptor de EGF foi identificado com o oncogene erb-B (do virus AEV causador de eritroblastose aviária) (Downward et al, 1984); alto grau de homologia foi descrito para c-fms (o oncogene do virus de sarcoma felino de Mc Donough) e o receptor de CSF ("colony stimulating factor"), um fator de crescimento do sistema hemopoiético (Sherr et al, 1985). O esforço conjunto de dois laboratórios sendo um de fatores de crescimento (de C. Stiles) e outro de oncogenes (de P. Leder) levou à descoberta de que entre os genes induzíveis por PDGF encontra-se o protooncogene c-myc (Kelly et al, 1983).

Nesta época já estavamos transfectando células Balb-3T3 com oncogenes clonados (EJ-ras, v-src e o próprio c-myc) com a finalidade de ver se a expressão destes genes tornava estas células independentes de PDGF, o que indicaria envolvimento dos seus produtos na ação deste fator de crescimento. Utilizando então uma construção de c-myc onde o gene está sob a ação de um promotor viral (MMTV) induzível por glucocorticóides pudemos mostrar que a alta expressão de c-myc realmente torna células Balb-3T3 parcialmente independentes de PDGF (Armelin et al, 1984) lançando o produto de c-myc como forte candidato a mediador intracelular de PDGF. O fato da independência ser apenas parcial e de já ter sido mostrado que havia um grupo (família) de genes induzíveis por PDGF (Cochran et al, 1983) tornava imperioso invocar outros mediadores intracelulares. Em 1984, outro protooncogene emergiu como candidato: c-fos identificado entre os genes induzidos por PDGF (Greenberg & Ziff, 1984; Kruijer et al, 1984; Müller et al, 1984; Cochran et al, 1984). Confirmando a previsão de Stiles (1983) alguns protooncogenes codificam para fatores de crescimento (caso de sis/PDGF); outros codificam para receptores de fatores de crescimento (EGF/erb B) e outros ainda codificam para mediadores intracelulares da ação de fatores de crescimento (myc, fos).

É possível que o controle da proliferação de células 3T3 por PDGF dependa da ação conjunta (cooperativa) dos produtos destes 2 protooncogenes (e/ou outros genes já clonados mas ainda não identificados). Cooperação entre produtos de oncogenes para o estabelecimento do fenótipo transformado, tem

sido encontrada para varios sistemas (Land et al, 1983; 1986; Cleveland et al, 1986; Vogt et al, 1986). O controle da proliferação e a subversão deste controle parecem depender do fino balanço entre produtos (onco)gênicos regulatórios. Entender as possiveis interações entre produtos de oncogenes e seus reflexos no aparecimento da transformação maligna são os desafios que tenho procurado enfrentar. No trabalho relatado nesta tese focalizo as interações entre os produtos do oncogene v-fos e do protooncogene c-myc, tendo em mente esclarecer o papel destas proteínas na ação dos fatores de crescimento do tipo competência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Plasmídios e Bactérias

A lista de plasmídios utilizados encontra-se na Tabela I. Todos, exceto BglII-p-FBJ-2 foram gentilmente cedidos por:

T. Roberts & D. Kaplan (Dana Farber Cancer Institute) - HSV-neo

P. Leder & H. Potter (Harvard Medical School) - pSV-neo

P. Leder & T. Stewart (Harvard Medical School) - MMTV-H3-myc e MMTV-Xba-myc

I. Verma & T. Curran (Salk Institute, California) - pFBJ-2

R. Weinberg (MIT, Boston) - pEJ 6.6

P. Leder & K. Kelly (Harvard Medical School) - sondas de M13

O plasmídio BglII-p-FBJ-2 foi construído em nosso laboratório partindo de pFBJ-2 (Curran et al, 1982). Após digestão total com BglII, o fragmento de 7.7 kb foi eletroluído, precipitado com etanol, ressuspenso em tampão de ligase (50 mM Tris-Cl pH 7,6; 10 mM $MgCl_2$;10 mM DDT; 1 mM ATP). Após adição de ligase de T4 (1 unidade/μg DNA) e incubação por 2 h à 37 °C, o DNA foi recuperado e utilizado para transformar bacterias HB101.

Todos os plasmídios são mantidos em HB101.

Tabela I: PLASMÍDIOS

	VETOR	INSERTO	PROMOTOR	REF.
MARCADOR GENÉTICO				
HSV-neo	pBR322	transposon Tn5 bacteriano	LTR de Harvey sarcoma	T.Roberts & D. Kaplan (não publ.)
p SV -neo 7	pBR327	transposon Tn5 bacteriano	de SV40	Southern & Berg, 1982
ONCOGENES RECOMBINANTES				
MMTV-H3-myc	pBR322	c-myc camund.	LTR de Mouse Mammary Tumor	Stewart et al, 1984
MMTV-Xba-myc	pBR322	c-myc camund. (2º e 3º exons)	LTR Mouse Mammary Tumor Virus	Stewart et al, 1984
pFBJ-2	pBR322	v-fos do vírus FBJ de osteosarcoma	LTR do vírus FBJ	Curran et al, 1982
Bgl - -FBJ II	pBR 322	deleição de v-fos do pFBJ-2	LTR de vírus FBJ	M.C.S. Armelin (não publicado
pEJ-6.6. ras	pBR 322	c-ras ativado de tumor de bexiga	do próprio gene ras	Shih & Weinberg, 1982
FRAGMENTOS PARA SONDAS				
M13-1st exon	M13	fragmento do 1º exon c-myc camund.	-	Kelly et al, 1983
M13-β 2-microglobulin	M13	fragmento de β 2 microglobulina	-	

Para transformar HB101 com DNA de plasmídios, utiliza-se o método de $CaCl_2$ de Mandel & Higa, 1970. Culturas em fase exponencial (OD_{600nm} = 0,3) crescendo em meio LB (10g triptona; 5g extrato levedura; 10 g NaCl por litro são resfriados à 0 °C, centrifugadas e o "pellet" de bactérias ressuspenso em 20 mM acetato de sódio pH 6,5; 0,1M $CaCl_2$. Após incubação por 20 min. no gelo, as bactérias são coletadas e e ressuspensas no mesmo tampão frio. Após uma hora estas bactérias agora "competentes" são misturadas com 100-500 ng DNA transformante e incubadas por 20 min no gelo. Em seguida submete-se as bactérias a um choque térmico (2 min, 42 °C): adiciona-se meio LB fresco e incuba-se à 37 °C por 1 h (sem agitação) antes de plaquear amostras de diluição seriada em placas de agar-LB-A (meio LB contendo 50 g/ml ampicilina).

Colônias de transformantes (que cresceram em placas LB-A) são usadas para preparação de DNA de plasmídios e para manter estoques glicerinados (cultura exponencial em 40% glicerol, mantida à -70 °C).

Para preparação de DNA de plasmídio em grande escala, utiliza-se o método de lise alcalina de Birnboim & Doly (1979) modificado. Prepara-se uma pré-cultura em meio LB-A; dilui-se a pré-cultura 1/100 em 400 ml meio LB-A e mantem-se sob agitação até OD_{600nm} = 0,6. Adiciona-se então cloranfenicol (170 µg/ml) para amplificar o DNA plasmidial e incuba-se até o dia seguinte. Após coleta das bactérias o "pellet" é ressuspenso em tampão GET (50 mM glicose; 50 mM Tris-Cl pH 8,5; 10 mM EDTA). Lisozima (25 mg/ml) é adicionada (10 min. à temperatura

ambiente e as bactérias lisadas por adição de 0,2 N NaOH; 1% SDS (30 min no gelo). DNA de alto peso molecular e proteínas são removidos por adição de 1 volume de 3M acetato de potassio pH 4,8. O precipitado é removido e o sobrenadante (contendo o DNA plasmidial) é precipitado com 0,6 volume de isopropanol. O precipitado é coletado, ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 mM EDTA). Este material pode ser tratado ou não com RNase (10 μg/ml) e proteinase K (30μg/ml) antes de ser purificado em CsCl.

A purificação do DNA plasmidial é feita por centrifugação em gradiente de CsCl segundo Maniatis et al,1982.

Todas as preparações de plasmídios são certificadas através de diagnóstico com enzimas de restrição e eletroforese dos produtos em gel de agarose. Alíquotas de DNA são mantidas à -20 ^{o}C.

2.2. Linhagens de células

A linhagem Balb-3T3 foi obtida do laboratório de C. Stiles (Dana Farber Cancer Institute, Boston) numa passagem muito próxima à população isolada por Aaronson & Todaro (1968). Estoques desta linhagem são mantidos congelados; a cada 6-8 semanas ou a cada experimento de transfecção uma amostra é descongelada. Registros de cada cultura são mantidos cuidadosamente.

Tabela II: LINHAGENS CELULARES

	REF.	DESCRIÇÃO
Balb-3T3	Aaronson & Todaro	Células de embrião de camundongo. Parental dos transfectantes.
myc 7E	Armelin et al 1984	Transfectante de MMTV-Xba-myc.
myc 9E	Armelin et al 1984	Transfectante de MMTV-H3-myc.
B22	esta tese	Transfectante de pFBJ-2 (v-fos).
B44	esta tese	Transfectante duplos de MMTV-H3-myc e pFBJ-2 (v-fos).
B47	esta tese	
EJ-A	esta tese	Transfectante de pEJ-6.6 (ras).

O meio de cultura consiste de DME (meio de Dulbecco) suplementado com 10% FCS (soro fetal bovino).

As culturas são mantidas em garrafas ou placas, sob atmosfera de 5% CO_2 - 95% ar.

Estoques de cada linhagem (ver Tabela I) são conservados em 10% DMSO no meio de cultura acima e mantidos em N_2 liquído.

2.3. Transfecção de células Balb-3T3

O método que Graham & van der Eb (1973) desenvolveram para estudar a infectividade de adenovírus baseia-se na formação de um co-precipitado de DNA e fosfato de cálcio.

Somente DNA plasmidial purificado em Cs Cl e certificado por diagnóstico de restrição, é utilizado.

Culturas recém-descongeladas de Balb-3T3 são plaqueadas ($4-5 \times 10^5$ células/placa de 6 cm ϕ)15-20h antes da transfecção, em 10% FCS-DME.

A mistura de DNA para cada placa é preparada de modo a ter: 15μg DNA carregador (DNA de salmão sonicado e desnaturado por calor); 1μg DNA marcador (contendo o gene neo que permite selecionar os transfectantes com base na resistência a geneticina G418); 20μg DNA recombinante contendo oncogene. Note-se que a razão DNA marcador/oncogene é mantida 1/20 ou 1/40. Algumas placas recebem apenas DNA carregador (controle da seleção com G418) e outras recebem DNA carregador e marcador genético.

A mistura de DNA (num volume máximo de 50μl) é suspensa em 0,5 ml tampão HEBS (8g/l NaCl; 0,38 g/l KCl; 0,1g/l Na_2HPO_4 anidro; 1g/l glicose; 5g/l tampão HEPES. Após acertar o pH para 7,1 o tampão é esterilizado por filtração). O precipitado é formado por adição de $CaCl_2$ para concentração final 0,125M. Após 20 min à temperatura ambiente, esta mistura é gotejada nas placas as quais ficam à temperatura ambiente e atmosfera normal por 0,5 h. Depois deste período as placas são incubadas à 37 ^oC e 5% CO_2 por 4 h para facilitar a formação do precipitado.

O meio é então removido e as placas submetidas a choque de glicerol 15% em HEBS por exatamente 4 minutos. O glicerol é removido e as culturas incubadas em 10% FCS-DME contendo 5 mM butirato de sódio (Gorman, 1985) o qual aumenta a eficiência da transfecção. Após 24 h o butirato é removido e as culturas incubadas por mais 2 dias em meio fresco 10% FCS-DME.

Ao cabo deste período cada placa é tripsinizada e seu conteúdo subdividido na base de 1:5 em placas contendo o meio seletivo (10% FCS-DME com 500μg/ml geneticina G418 da Gibco ou da Sigma).

As placas são mantidas em meio seletivo por 2-3 semanas (com renovação do meio a cada 3 dias) até o desenvolvimento de colonias G418 - resistentes.

Para isolamento de linhagens trasfectantes colonias $G418^r$ bem isoladas são recolhidas com auxílio de aneis de clonagem, por tripsinização. Estas células são mantidas em meio seletivo até o congelamento de amostras.

2.4. Medidas do Crescimento de Células

Culturas subconfluentes são tripsinizadas para obtenção de uma suspensão homogênea de células em 5% FCS-DME. A suspensão é distribuida em placas de 35mm (Descarplast, Rio de Janeiro) ou bandejas de 24 poços (Costar, Estados Unidos) numa densidade de $5x10^3$ células/cm^2. No dia seguinte o meio é removido e, após lavagem com PBS, substituído por meio fresco de diferentes composições. A determinados intervalos de tempo, algumas culturas são tripsinizadas e fixadas com formol para posterior contagem do número de células. O conteúdo de cada placa ou poço é coletado em 0,3 ml tripsina; 0,6 ml PBSA e 0,1 ml formaldeído 37% para tubos Eppendorf que são armazenados e contados todos no mesmo dia em contador eletrônico do tipo Coulter (Celm, São Paulo).

2.5. Hormônios e Fatores de Crescimento

Insulina e hidrocortisona são da Sigma Chem. Co. Estoques concentrados (em água e etanol, respectivamente) são mantidos congelados.

EGF ("epidermal growth factor") é obtido da Collaborative Research (Boston, Estados Unidos).

FGF ("fibroblast growth factor") é preparado e gentilmente cedido por Angelo Gambarini e Paulo Lee Ho, do nosso laboratório. O material utilizado nesta tese corresponde a um "pool" de frações da coluna de carboximetil-Sephadex

(Gambarini & Armelin, 1982).

A fonte de PDGF ("platelet-derived growth factor") utilizada foi o chamado extrato de plaqueta, o qual também contém TGFs e outros materiais. Para preparar EXTRATO DE PLAQUETAS, procede-se da seguinte maneira: Bolsas contendo "papa de plaquetas" (concentrado de plaquetas em plasma) vencidas são gentilmente cedidas pelo Banco de Sangue do São Paulo.

O material de 30-50 bolsas é misturado e centrifugado (rotor GSA da Sorvall, 7 Krpm, 20 min) para coletar as plaquetas. Após lavagem em 0,15 M NaCl, as plaquetas são suspensas em 25 ml 0,15 M NaCl e congeladas (-20 ^{o}C) até o dia seguinte para lisar. Este lisado é então diluído 1:3 em 1,5 M NaCl, aquecido à 80 ^{o}C por 15 minutos e centrifugado (rotor SS34 da Sorvall, 15 Krpm, 20 min) para eliminar detritos. O sobrenadante é dializado extensivamente contra NaCl 0,15M, esterilizado por filtração em membrana Millipore (0,45μ) e armazenado no congelador em alíquotas. Para determinar a atividade mitogênica deste extrato de plaquetas, diferentes volumes do extrato (ou de uma diluição 1/10) são adicionados a cultura confluentes de Balb-3T3 em repouso e 5% plasma-DME (bandejas de 96 poços). Timidina-^{3}H é incorporada entre 12 e 24 h após a adição do extrato e as células processadas para autoradiografia.

Uma unidade de atividade = quantidade (μl) de extrato necessária para obter 50% de marcação (50% das células com núcleos radiativamente marcados).

TGFβ foi preparado e gentilmente cedido por

Anita Roberts (NIH, Bethesda).

2.6. Preparação de Plasma

Plasma humano, obtido do Banco de Sangue de São Paulo, é processado em bateladas de 1l. Após centrifugação para remoção de qualquer plaqueta residual, (rotor GSA; 8 Krpm, 1h) o sobrenadante é aquecido à 58 ^{o}C por 1 h, dializado extensivamente contra 0,15 M NaCl, centrifugado (idem acima), prefiltrado em bolachas filtrantes e depois filtrado, para esterilizar, em membrana Millipore 0,22μ. Alíquotas são mantidas à -20 ^{o}C.

2.7. Ensaio de Atividade Mitogênica (Armelin, 1973)

Culturas (esparsas ou confluentes) são submetidas à carência de soro (0,2% FCS-DME) ou à presença de 5% plasma por 24 h. Nestas condições células Balb-3T3 entram em repouso (estado G0).

Hormônios e/ou fatores de crescimento são adicionados às células G0 e sua atividade mitogênica avaliada após incorporação de timidina-^{3}H (0,5 μCi/ml; 10^{-7} M) por autoradiografia ou por medida da incorporação de ^{3}H-TdR em DNA. Para autoradiografia, as culturas são fixadas com TCA 10%, lavadas com etanol, secas e cobertas com emulsão fotográfica (Kodak NBT-2) ou "stripping-film" (Kodak Ar-10). Para medida da radiatividade, as culturas são processadas como para autoradiografia sendo, em seguida, o material fixado dissolvido em 0,5N NaOH. A solução

alcalina é embebida em papel de filtro grosso, e o filtro é lavado em TCA 5%, etanol e acetona, sêco e contado, em líquido de cintilação, no Cintilador Líquido para determinar cpm incorporado em DNA/placa.

2.8. Crescimento de células em Suspensão de agarose (M.C.S. Armelin, não public.)

Bandejas de 24 poços (Costar, Estados Unidos) são forradas com uma camada de 0,6% agarose em 10% plasma-DME (0,5 ml/ poço).

Uma suspensão homogênea de células é obtida por tripsinização, diluída seriadamente em 10% plasma-DME líquido e aplicada (em 100 μl) sobre a camada de agarose 0,6% com pipetador Gilson.

A solução de 0,3% agarose em 10% plasma-DME é então adicionada (1ml/poço). Após solidificação, meio líquido 10% plasma-DME é adicionado (o,5 ml/poço).

Hormônios e fatores de crescimento são adicionados ao meio líquido, o qual é renovado a cada 2-3 dias.

Ao cabo de 15-20 dias as colônias que se desenvolveram são contadas com auxílio de uma lupa.

2.9. Extração e Purificação de DNA e RNA de células de mamíferos, segundo Chirgwin et al, 1979 (modificado).

Células da linhagem parental (Balb-3T3) ou dos

transfectantes são mantidas em placas de 15 cm diâmetro em 10% FCS-DME até atingir a confluência ou a densidade de saturação correspondente.

O meio é então removido, as culturas lavadas com PBS e incubadas em 5% plasma-DME por 20-24 h. Após este período as placas são lavadas com PBS estéril e as células lisadas por adição de 2-3 ml de 4M isotiocianato de guanidina; 25 mM citrato de sódio pH 7,0; 0,1 M β-mercaptoetanol. O conteúdo de cada placa é raspado com lâmina de borracha ("policial") e transferido para a próxima placa.

O lisado celular (máximo de 3ml) é então colocado em tubo de nitrocelulose contendo 2ml de 5,7 M CsCl em 25 mM acetato de sódio pH 5,0. Após centrifugação (SW50.1; 17h; 38Krpm) a banda de DNA (no topo) é coletada com pipeta Pasteur grossa e o RNA (sedimentado no fundo) é ressuspenso em H_2O estéril.

O DNA é dializado, tratado com RNase (20 μg/ml) e proteinase K (30μg/ml), extraído com fenol/clorofórmio, precipitado com etanol e redissolvido em 0,1 x SSC.

Amostras de RNA e DNA são diluidas em TE para medidas de A260 e razão A260/A280 para apreciação da pureza do material.

2.10. Sondas radiativas de DNA

Três tipos de sondas foram preparadas por: a)"Nick translation"; b) "Oligolabelling"; c) Sonda de M13 (esta última

é descrita em 2.11.) utilizando α ^{32}P dATP preparado no laboratório de J.C. Maia; M.H. Juliani e S.L. Gomes do nosso Departamento.

A reação de "nick translation" foi feita como descrito em Maniatis et al, 1982. O método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983 e 1984) foi usado para preparar sondas por "oligolabeling". A atividade específica usualmente é 10^{8} dpm/ sg para "nick" e 10^{9} dpm/ g para sonda de OLB.

Normalmente usa-se apenas insertos (de preferência correspondentes apenas à região codificadora do gene).

2.11. Análise da integração e expressão de oncogenes nos transfectantes

DNA purificado como descrito no item 2.9. é digerido com enzima de restrição (em geral Eco R1), fracionado em gel de agarose, transferido para filtro de nitrocelulose e hibrizado segundo Southern (1975) para verificar a integração do oncogene de interêsse.

Para análise da expressão tem-se utilizado hibridização do tipo Northern (géis e "dot-blots") e ensaio de proteção da nuclease S1.

O fracionamento de RNA, feito em gel de agarose 1% contendo 2,2 M formaldeído e eletroforese em tampão MOPS é seguido de hibridização do tipo Northern segundo Thomas, 1980, descrito em Maniatis et al, 1982. "Dot blots" são feitos (segundo White & Bancroft, 1982): amostras de RNA total, em 15 x SSC,

são previamente tratadas com formaldeido por 15 min. à 65 °C, diluidas seriadamente 1:2 e aplicadas (em 100 μl) no aparelho ("minifold") da BRL contendo o filtro de nitrocelulose. Os filtros são assados à 80 °C por 2 h e depois hibridizados, com sondas de DNA marcado radiativamente com ^{32}P, em: 5 x SSPE; 50% formamida; 5 x solução de Denhardt; 0,1% SDS; 5% sulfato de dextrana e 100 μg/ml DNA de timo.

Hibridização de RNA, fracionado em gel ou aplicado em "dots", tem funcionado bem para detectar a expressão de fos; já para myc o ensaio de proteção da nuclease S1 tem dado melhores resultados.

Para o ensaio de S1 (Ley et al, 1982) uma sonda de DNA simples fita, correspondente a um fragmento do gene clonado em M13, é preparada da seguinte maneira: 10-30 ng DNA de M13 recombinante são misturadas com 1 ng de "primer" de M13 (15 bp) em 10 l de tampão contendo 10 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl. Após incubação à 65 °C por 15 min. e resfriamento lento até temperatura ambiente, a extensão do "primer" é iniciada por adição 30 mM de dCTP, dGTP e dTNP frios, 150 μCi α-^{32}PdATP e 10 unidades de DNA polimerase de Klenow (fragmento grande). Após polimerização (1 h, temperatura ambiente) e caça com 20 mM dATP frio (15 min, temper. amb) o DNA é digerido com uma enzima de restrição que cliva logo após o inserto (Hind III) por pelo menos 1 h à 37 °C. O material é então tratado com 85% formamida, misturado com tampão TBE e corantes, aquecido por 2 min. 100 °C e aplicado a gel desnaturante (5% acrilamida; 8 M uréia). Após a corrida o gel é envolto em

plástico e exposto a filme de raio-X por alguns minutos para localizar o fragmento radiativo que será usado como sonda. Este fragmento é recortado do gel, eletroluido em TBE (por 2 h, 90 V) precipitado em etanol usando t RNA como carregador, coletado e ressuspenso em H_2O. A radiatividade (Cerenkoff counts) é determinada por contagem de alíquotas aplicadas a papel Whatmann 3MM em espectrômetro de cintilação. Alíquotas da sonda (cerca de 50.000 cpm) são então hibridizadas, em solução, com 10 μg RNA total na seguinte solução: 20 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 mM EDTA; 500 mM NaCl; 0,1% SDS e 75% formamida. Após desnaturação (15 min, 75 ^{o}C) a mistura é incubada por pelo menos 2 h na temperatura adequada (58 ^{o}C para o fragmento do primeiro exon de <u>myc</u> e 52 ^{o}C para β_2-microglobulina).

Logo após a hibridização, a nuclease S1 é adicionada (1000 unidades/amostra de RNA) e a reação (em 0,3 M NaCl; 60 mM acetato de sódio pH 4,5; 3mM $ZnSO_4$ e 10 g tRNA) incubada por 1 h à 37 ^{o}C. Cada reação é extraída com 1 volume de mistura fenol/clorofórmio, precipitada com etanol e o precipitado, ressuspenso em formamida contendo corantes e desnaturado por calor (2 min, 100 ^{o}C) é aplicado a gel desnaturante de sequenciamento (5% acrilamida, 8 M uréia). Ao final da corrida o gel é seco e exposto a filme de raio X.

2.12. Medidas do potencial tumorogênico de células

Culturas em fase exponencial de crescimento são tripsinizadas e as células ressuspensas em DME (sem soro) numa

concentração de 10^7 células/ml. Cerca de 10^6 células (em 0,1 ml) são injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos Balb-c.

Os animais imunocompetentes utilizados provêm do Biotério do Instituto de Química (USP). Os camundongos imunodeprimidos do tipo "nude" foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ricardo Brentani e os experimentos conduzidos no Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (São Paulo).

3. RESULTADOS

3.1. Construção de mutantes de células Balb-3T3 por introdução de oncogenes clonados

Para estudar o papel dos oncogenes myc e fos no controle da proliferação celular, células Balb-3T3 foram transfectadas com oncogenes clonados visando gerar transfectantes simples (myc, fos) e duplos (myc + fos). Os plasmídios utilizados estão esquematizados na fig.1. pFBJ-2 (Curran et al, 1982) possui o oncogene viral v-fos sob ação do próprio promotor viral (forte); este plasmídio consiste do provírus inteiro do vírus FBJ clonado no vetor pBR 322. O plasmídio MMTV-H3 myc (Armelin et al, 1984) possui o protooncogene c-myc de camundongo, com seus 3 exons e 2 introns numa construção que inclui o promotor MMTV do vírus de tumor de mama murino, o que torna a expressão de c-myc induzível por hormônios glucocorticóides (Parks et al, 1974; Stallcup et al, 1979).

Cotransfecção do marcador genético HSV-neo (fig. 1) e oncogenes, numa proporção de 1:20, foi adotado para aumentar a probabilidade das colônias G418 resistentes terem também integrado o oncogene de interesse.

A seleção baseou-se exclusivamente na resistência a geneticina G418 conferida pelo gene neo.

Linhagens celulares de Balb-3T3 transfectadas com myc haviam sido geradas anteriormente (Armelin et al, 1984, 1985). A eficiência de obtenção de colônias $G418^r$ variava entre 10^{-4} e 10^{-3}, ou seja 10^2 - 10^3 colônias $G418^r/10^6$ células/ g DNA.

PLASMÍDIOS RECOMBINANTES

MARCADORES GENÉTICOS

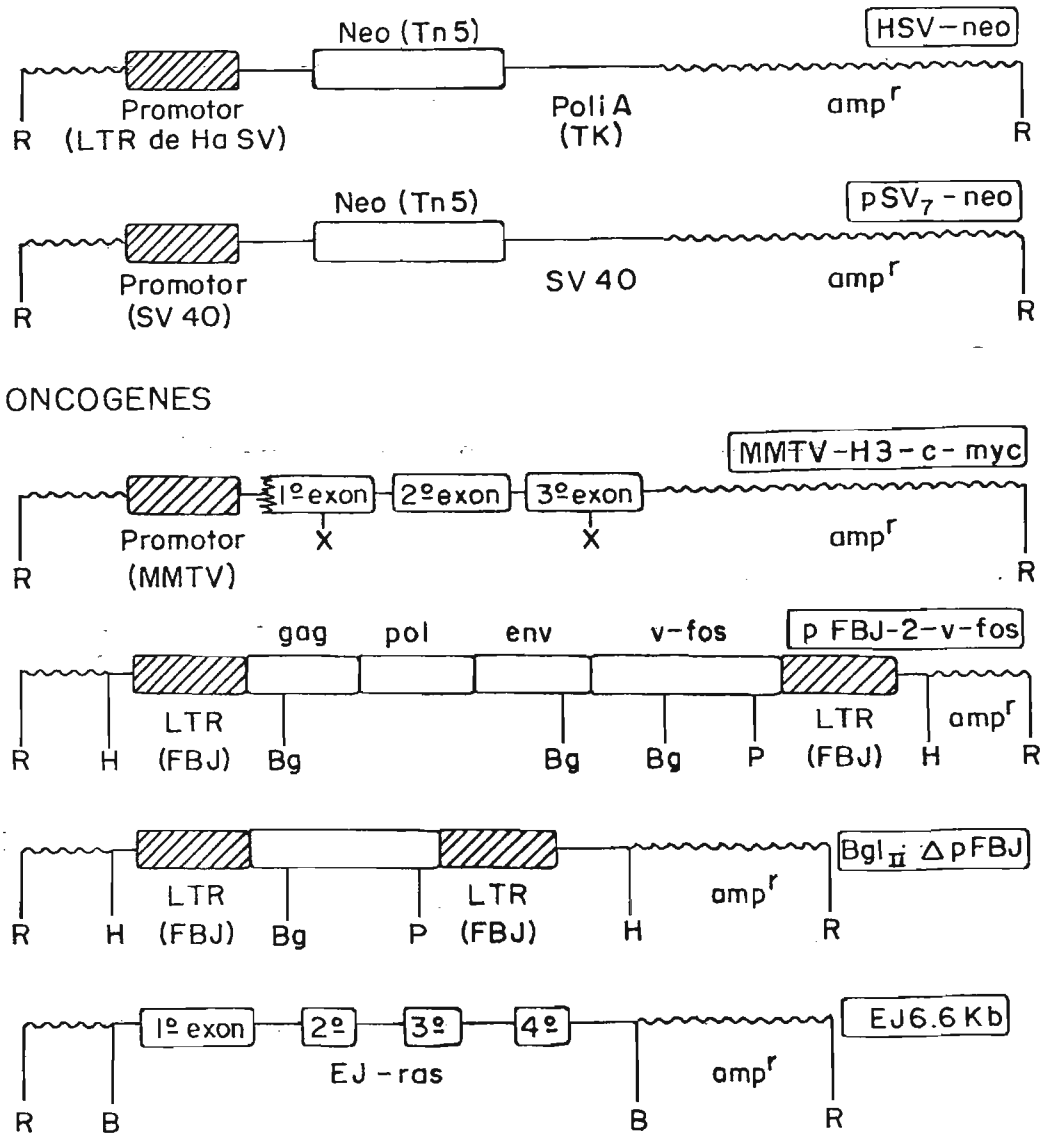

Fig. 1 Esquema dos plasmídios recombinantes utilizados para transfectar células Balb-3T3. Refs. na Tabela I. Promotor ▨; ∿∿ pBR322; ampr : gene β-lactamase que confere resistência a ampicilina. As letras correspondem a sítios atacáveis por enzimas de restrição: EcoRl (R); Xhol (X); Hind III (H); BglII (Bg); PvuII (P); Bam Hl (B).

Ao tentar gerar transfectantes de v-fos através da cotransfecção de HSV-neo e pFBJ-2, verificou-se que o rendimento de colônias $G418^r$ era drasticamente reduzido (fig. 2) e tabela III). Entretanto, se as células são cotransfectadas com v-fos e c-myc, este efeito de v-fos é contrabalançado e o rendimento de colônias $G418^r$ passa a ter valores intermediários (Tabela III). pFBJ-2 diminui também o rendimento de colônias $G418^r$ resultantes da transfeção de EJ-ras (Tabela III). A interferência de pFBJ-2 com o rendimento de colônias $G418^r$ foi confirmado usando outro vetor (pSV_2-neo) contendo o mesmo marcador genético neo (Tabela IV).

Para verificar se este efeito de pFBJ-2-v-fos era devido a v-fos ou a outras sequências virais presentes neste plasmídio, construiu-se o plasmídio Bgl-Δ-pFBJ-2. DNA purificado de pFBJ-2 foi digerido com Bgl II obtendo-se, como previsto através do mapa de restrição (Curran et al, 1982) 3 bandas (7,8; 1,6 e 0,6 kb) conforme mostra a fig. 3. A banda de 7.8kb foi eletroeluída e o DNA precipitado com etanol e ressuspenso em tampão adequado para ação de ligase. Após recircularização da banda de 7.8 kb com ligase de T4, este DNA foi utilizado para transformar bactérias HB101. Colônias transformantes, selecionadas pela resistência a ampicilina, foram utilizadas para preparar DNA de Bgl-Δ-pFBJ-2.

A Tabela V mostra os resultados de rendimento de colônias $G418^r$. Como se pode observar, quando se utiliza Bgl-Δ-pFBJ-2, no qual a maior parte da sequência codificadora de v-fos foi eliminada, não mais se observa diminuição do

Fig. 2 Colônias G418r obtidas por cotransfecção de células Balb-3T3 com o marcador genético HSV-neo +/- oncogenes: a) apenas HSV-neo; b) HSV-neo + pFBJ-2-v-fos; c) HSV- neo + MMTV-H3-c-myc; d) HSV-neo + pFBJ-2-v-fos + MMTV-H3-c-myc, Em d aparecem marcas dos anéis de clonagem usados para remover algumas colônias.

Tabela III: A integração de pFBJ-2 (v-fos) reduz o rendimento de colônias $G418^r$, mas c-myc e EJ-ras contrabalançam este efeito.

Plasmídios transfectados	No. colônias $G418^r$/placa		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
HSV-neo	146	85	100
HSV-neo + pFBJ-2 (20 μg)	14	3	5
HSV-neo + pFBJ-2 (40 μg)	6	3	3
HSV-neo + MMTV-H3-myc	98	83	65
HSV-neo+pFBJ-2+MMTV+H3-myc	44	42	43
HSV-neo+pEJ 6.6	-	179	190
HSV-neo+pEJ 6.6+pFBJ-2	-	53	63

Tabela IV: O efeito inibitório de pFBJ-2 no rendimento de colônias $G418^r$ é independente do vetor que carrega o marcador genético neo.

Plasmídios transfectados	No. colônias $G418^r$/placa	
	Exp. 1	Exp. 2
pSV_7-neo	525	105
pSV_7-neo + pFBJ-2	353	50
pSV_7-neo + $Bgl_{II}\Delta$ pFBJ	—	225

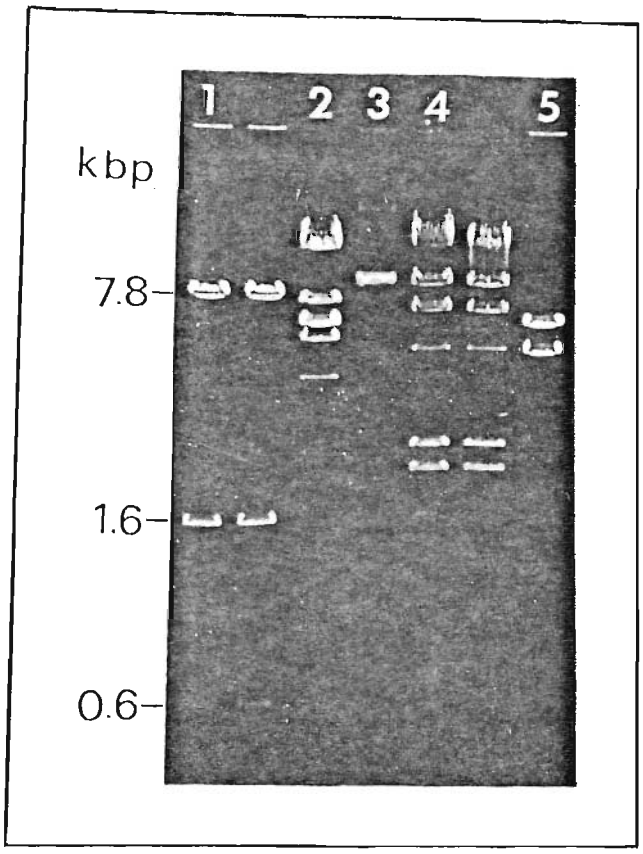

Fig. 3 Construção do recombinante BglII pFBJ com deleição de parte da sequência codificadora de v-fos. DNA do plasmídio pFBJ-2 (canais 1, 3 e 5) foi digerido com BglII (canal 1) ou Hind III (canal 5) ou não digerido (canal 3). Como padrões de peso molecular inclui-se DNA de fago digerido com EcoRl (canal 2) ou Hind III (canal 4).

Tabela V: O plasmídio Bgl Δ pFBJ, que tem deleção na sequência codificante para v-fos, não inibe a formação de colônias $G418^r$.

Plasmídios transfectados	No. de colônias $G418^r$/placa	
	Exp. 1	Exp. 2
HSV-neo	10	24
HSV-neo + pFBJ-2	zero	6
HSV-neo + Bgl Δ pFBJ	8	39

número de colônias $G418^r$, sugerindo, portanto que o produto de v-fos pode ser o responsável pelo efeito observado.

Para geração das linhagens transfectantes, colônias $G418^r$ foram clonadas e mantidas sob pressão seletiva até o congelamento de amostras. Ao contrário de todos os outros transfectantes até então obtidos (Armelin et al, 1984, 1985) células de colônias $G418^r$ transfectadas com pFBJ-2 apresentavam dificuldades para crescer e alterações morfológicas, tendendo à degeneração e morte celular. Empiricamente, verificou-se que a adição de extrato de plaqueta a estas culturas permitia o desenvolvimento das células e isolamento de linhagens (fig. 4). Entretanto não foi possível contrabalançar o efeito negativo de p FBJ-2 no rendimento de colônias G418 através da adição de extrato de plaquetas às culturas durante todo o processo de seleção com G418.

Ao contrário dos transfectantes simples v-fos, os transfectantes duplos (v-fos+c-myc) e simples c-myc (como myc7 E e myc9E anteriormente isolados e descritos em Armelin et al, 1984) não têm nenhuma dificuldade para crescer. Até agora isolou-se cerca de 12 transfectantes v-fos, 20 c-myc e 9 duplos (v-fos+c-myc) alguns dos quais estão sendo estudados e caracterizados.

3.2. Análise da integração e expressão dos oncogenes myc e fos nas linhagens transfectantes

Para verificar a integração de oncogenes exógenos nos transfectantes utiliza-se o método de hibridização do tipo

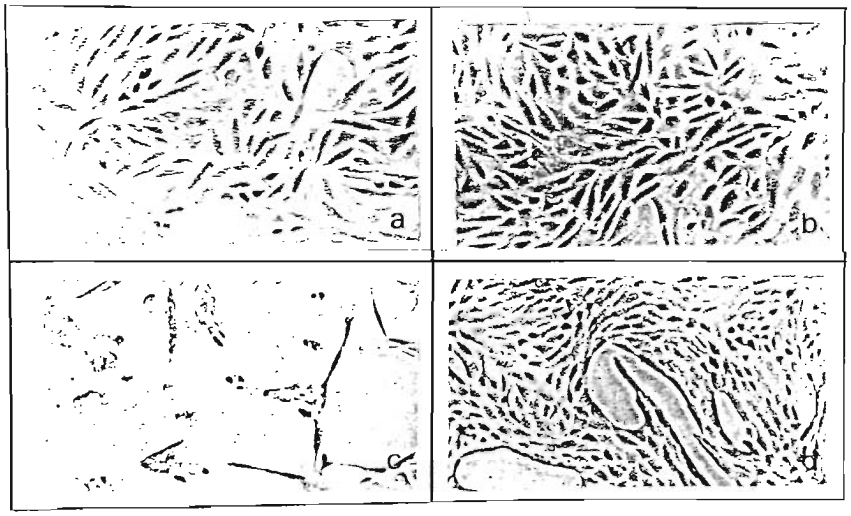

Fig. 4 Crescimento de células parentais Balb-3T3 (a, b) e do transfectante B22 (v-fos) (c, d) em meio contendo 10% FCS-DME suplementado (b, d) ou não (a, c) com extrato de plaquetas (5-10 unidades/ml).

Southern (1975).

A expressão de myc é analisada através do ensaio de proteção da nuclease S1. Apesar de mais laborioso, este método tem funcionado melhor do que hibridização do tipo Northern. Para o ensaio de S1 utiliza-se uma sonda de fita simples radioativamente marcada. Dispõe-se de fragmentos do protooncogene c-myc (1o. ou 2o. exon) de camundongo clonados em M13. A preparação da sonda (descrita em Métodos) consiste em desnaturar o DNA de M13, juntar com "primer" especial de M13 e estender, à partir deste primer, a cadeia de DNA utilizando DNA polimerase (fragmento de Klenow) e pelo menos um desoxirribonucleotídeo trifosfato marcado com P^{32}. Após restrição com uma enzima que cliva o DNA logo após o fragmento de myc, o DNA é desnaturado e fracionado em gel desnaturante (8 M uréia) de acrilamida. Na figura 5 ilustra-se a obtenção de uma sonda de 401 bases correspondente ao 1o. exon do c-myc de camundongo. Na mesma figura encontra-se a sonda de β_2-microglobulina (960 bases) que é hibridizada com amostras paralelas de RNA como controle para a quantidade total de RNA. Amostras (10 μg) de RNA total (obtidas de culturas confluentes mantidas em plasma por 24h) são então hibridizadas, em solução, com a sonda preparada. Após hibridização, a mistura é tratada com nuclease S1 que é específica para ácido nucléico de fita simples. O híbrido (protegido da S1) é desnaturado e o material analisado em gel desnaturante (8M uréia) de acrilamida. Os resultados de expressão de myc por ensaio de S1 e por hibridização do tipo Northern, podem ser vistos na fig. 6. É possível distinguir transcritos de c-myc endógeno (iniciados em

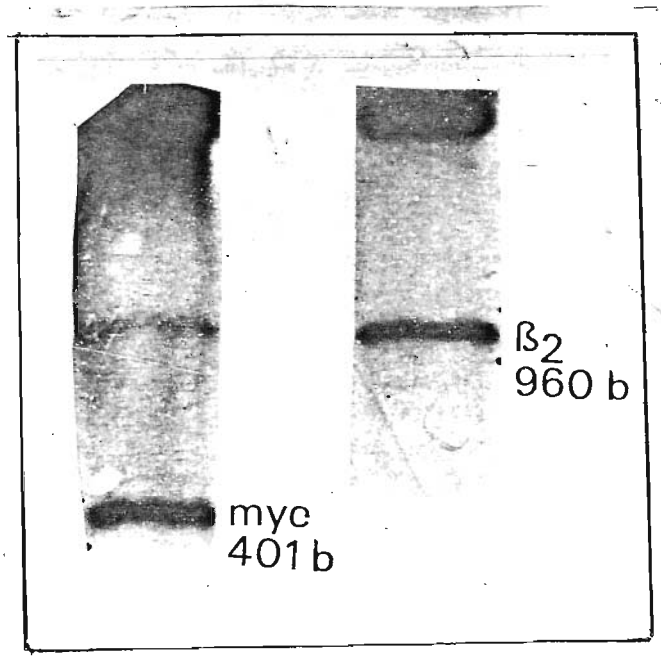

Fig. 5 Preparo de sondas de DNA simples fita para usar em ensaios de Sl. Os fragmentos dos genes c-myc (1º exon, camundongo) e β2-microglobulina dão sondas de 401 e 960 bases, respectivamente.

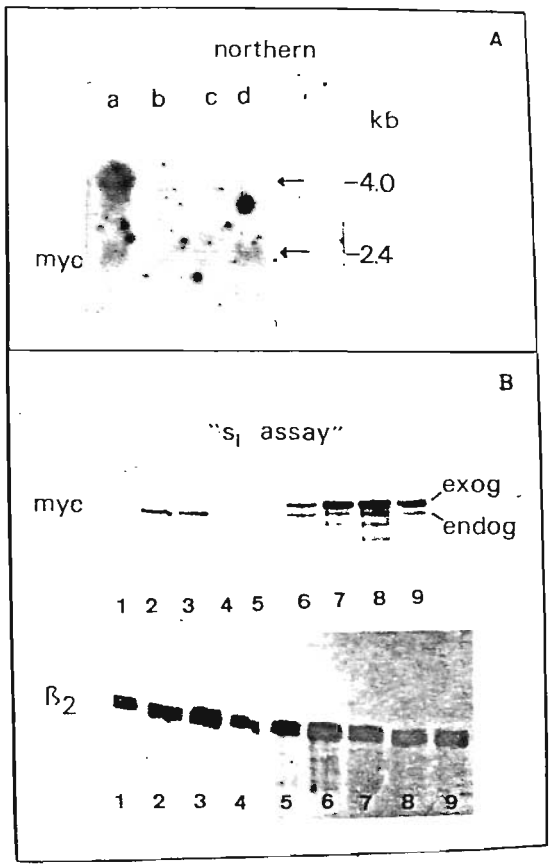

Fig. 6 Expressão de myc analisada por gel de Northern (A) ou ensaio de S1 (B). Canal a: transfectante myc 7E induzido com hidrocortisona; b-d: parental Balb-3T3 não restimulada (b) ou restimulada com PDGF por 0,5h(c) ou 3h (d). No ensaio de S1: parental Balb-3T3 (canais 1-5) sincronizada em G0 e não restimulada (canal 1, 4 e 5) ou tratada com PDGF por 3h (canal 2,3) ou com hidrocortisona (canal 5) e o transfectante myc 9E (6-9) não restimulado (6) ou tratado apenas com hidrocortisona (7) ou com hidrocortisona + EGF (8) ou apenas com EGF (9). Alíquotas paralelas de 10 g de RNA total foram hibridizadas respectivamente com a sonda de myc e a sonda de 2-microglobulina.

seus próprios promotores P1 e P2; em células Balb-3T3 iniciados preferencialmente de P2) dos transcritos exógenos (iniciados no promotor MMTV do plasmídio MMTV-H3-myc utilizado para a obtenção destes transfectantes). A fig. 6 mostra que: a) conforme descrito anteriormente, a expressão de myc é baixa em células que estão em G0 (parental não estimulada) e alta em células submetidas a tratamento com PDGF por 3 h; b) o transfectante myc 7 E tratado com hidrocortisona (hormônio que induz o promotor MMTV) apresenta transcritos de aproximadamente 4kb correspondentes ao myc exógeno (apesar de myc 7E possuir apenas o 2o. e o 3o. exons no myc exógeno, a transcrição se inicia do promotor de MMTV o que acarreta em tamanho maior do que o transcrito endógeno); c) o transfectante myc 9E apresenta alta expressão constitutiva do myc exógeno, mas esta expressão é ainda maior quando a célula é tratada com hidrocortisoma (superando a parental tratada por 3 h com PDGF). Na fig. 6 encontram-se também os resultados do ensaio de proteção de S1 com uma sonda de M13 para β_2-microglobulina, um gene estrutural cuja expressão não é sujeita à regulação e que, portanto, permite controlar a quantidade total de RNA na amostra. Como se pode verificar os resultados obtidos com a sonda de myc não são devidos a diferentes quantidades de RNA. Como mostrado aqui e confirmando resultados anteriores, myc 7E e myc 9E são transfectantes nos quais a expressão do myc exógeno pode ser modulada por hormônios glucocorticóides.

Os resultados da expressão de myc no transfectante B47 encontram-se na fig. 7A. Como se pode verificar, células B47 apresentam baixo nível de expressão constitutiva de myc, mas

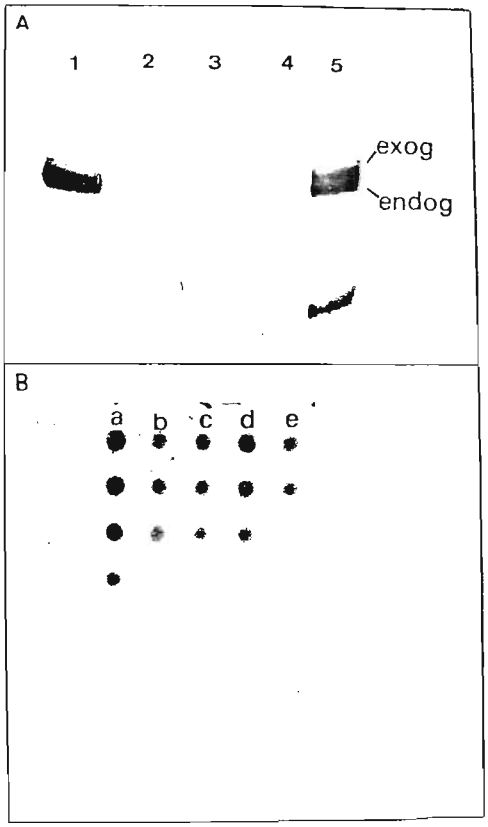

Fig. 7 Expressão de myc analisada por ensaio de S1 (A) e por hibridização Dot-Blot (B). Célula parental Balb-3T3 (canal 1-3) restimulada com PDGF por 3h (1); não restimulada (2); tratada com hidrocortisona (3); transfectante duplo B47 (c-myc + v-fos) não tratado (4) ou tratado com hidrocortisona (5). Em B, canal a: transfectante com alta expressão de myc endógeno; b e c parental Balb-3T3 não restimulada (b) ou restimulada com PDGF por 0,5 h (c); d: transfectante duplo B44 (c-myc + v-fos); e: transfectante simples B22 (v-fos).

este nível é significativamente aumentado quando as células são tratadas com hidrocortisona. A fig. 7B mostra que o transfectante B44 apresenta expressão basal constitutiva significante de myc quando comparado com a parental não estimulada.

Para analisar a expressão de fos nos transfectantes utilizou-se hibridização do tipo Northern (géis e "dot-blots"). As mesmas preparações utilizadas para medir a expressão de myc são usadas para medir fos. É importante lembrar que este RNA provem de culturas confluentes mantidas em meio contendo plasma (5%) por 24 h. Amostras (15 g) de RNA são fracionadas em géis desnaturantes de agarose-formaldeído. Após transferência, o filtro de nitrocelulose é hibridizado com sondas radioativamente marcadas com ^{32}P por "nick translation" ou por "oligolabelling". Dois fragmentos de pFBJ-2 têm sido utilizados: um de 5,8kb que corresponde ao provírus inteiro e que é obtido por digestão com Hind III e outro de 1,3kb que corresponde apenas a sequência codificante de v-fos e que é obtido por digestão com PVU II e Bgl II. Resultados idênticos foram obtidos com ambas as sondas. Os resultados, apresentados nas figs 8 e 9 mostram claramente que: a) na linhagem parental A31, o transcrito de 2,2 kb, correspondente ao c-fos só aparece em células tratadas com PDGF por tempo curto (30 minutos) ou seja, nas células estimuladas com PDGF por 3 h ou tratadas com hidrocortisona por 24 h, não se detecta expressão constitutiva de c-fos. A expressão de c-fos é detectável, mas não tão expressiva em células NIH-3T3 tratadas com PDGF por 1 h; b) tratamento com hidrocortisona, que provoca indução da expressão do c-myc exógeno na linhagem myc 7E

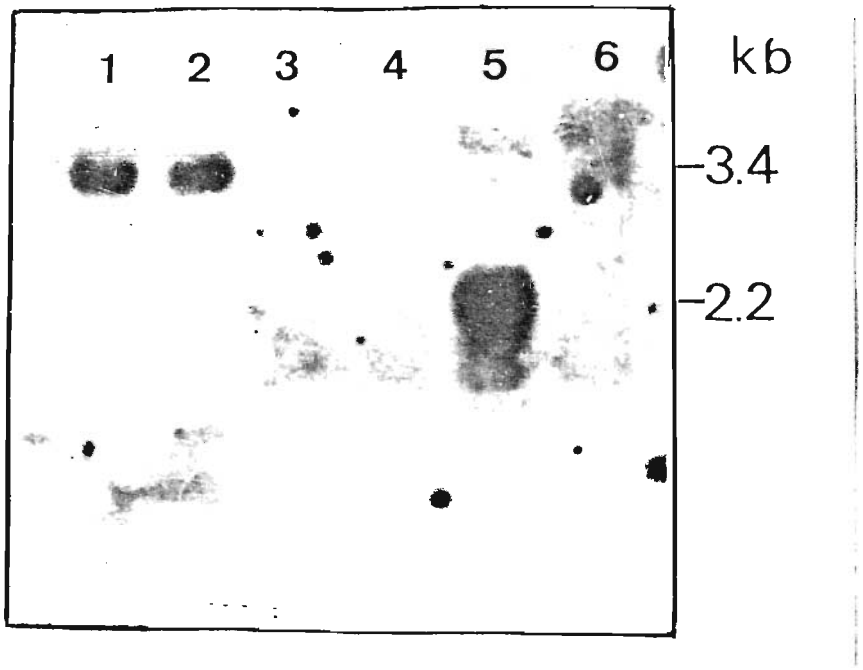

Fig. 8 Expressão de fos analisada por hibridização tipo Northern. 1 e 2: duplos transfectantes B44 (1) e B47 (2); 3: transfectante simples myc 7E tratado com hidrocortisona; 4-5: parental Balb-3T3 não restimulada (4) ou restimulada com PDGF por 0,5 h (5) e 3 h (6). Os transcritos de fos endógeno (2,2 kb) e exógeno (3,4 kb) estão indicados.

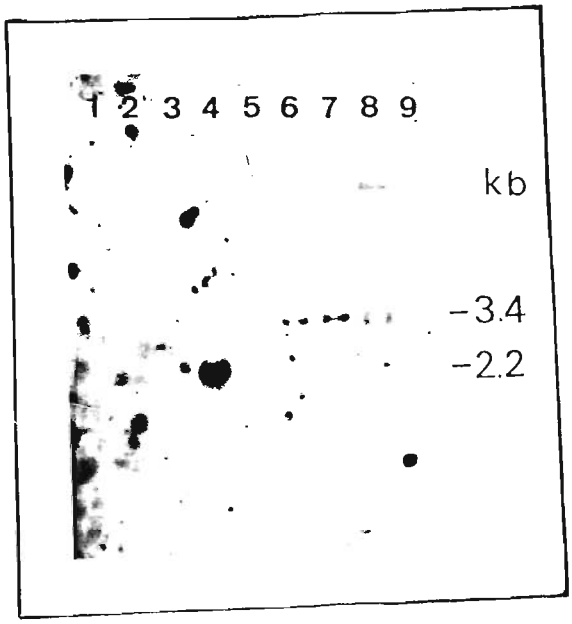

Fig. 9 Expressão de fos analisada por hibridização tipo Northern. 1 e 2:células NIH-3T3 não restimuladas (1) ou restimulada com PDGF por 1 h (2); 3-5: parental Balb-3T3 não restimulada (3) ou restimulada com PDGF por 0,5 h (4) e 3 h (5); 6 e 7: transfectante duplo B47 não tratado (6) ou tratado com hidrocortisona (7); 8: transfectante simples B21 (v-fos); 9: transfectante de EJ-ras não restimulado.

não leva ao aparecimento de transcritos de c-fos nesta linhagem; c) nos transfectantes duplos B44 e B47, por outro lado, altos níveis de um transcrito de 3,2 kb, correspondente a v-fos, são detectados enquanto nos transfectantes simples de v-fos este transcrito de 3,2 kb ou não é detectado ou aparece em níveis baixíssimos. A expressão constitutiva de v-fos nos duplos transfectantes é comparável aquela encontrada para c-fos na linhagem parental super induzida por 30 min de tratamento com PDGF.

As células B47 não induzidas por hidrocortisona apresentam alto nível de fos exógeno ao lado de um nível de c-myc endógeno muito baixo e equivalente ao da célula parental não estimulada. Esta verificação experimental permite responder uma questão atual importante: fatores de crescimento induzem a transcrição de c-fos (pico aos 30 min) e de c-myc (pico às 3 h) o que leva a supor que a proteína fos induzida seja mediadora na indução de c-myc. Para testar esta possibilidade outros autores usaram inibidores de síntese de proteína, durante a indução de c-fos e c-myc por fatores de crescimento (Greenberg e Ziff, 1984). Mas os resultados foram ambíguos e estes autores consideraram esta questão ainda aberta. Os resultados com B47 acima referidos resolvem a questão inequivocamente,pois mostram que alta expressão de fos não leva necessariamente, a aumento da expressão do c-myc endógeno indicando que o fator de crescimento (PDGF ou FGF) induz expressão sequencial de c-fos e c-myc independente um do outro.

Conclui-se, portanto, que foi possível gerar

transfectantes simples e duplos de MMTV-H3-c-myc e pFBJ-2-v-fos com características extremamente desejáveis e raras como a expressão induzível de c-myc (nos transfectantes myc 7E e myc 9E e duplos B44 e B47) e alta expressão constitutiva de c-myc (9E) e v-fos (B44 e B47)

3.3. Caracterização dos transfectantes simples (c-myc e v-fos) e duplos (c-myc+v-fos) de células Balb-3T

Diversos parâmetros estão sendo usados para analisar o efeito da expressão constitutiva dos oncogenes myc e fos no comportamento das células Balb-3T3: transformação morfólogica, resposta a hormônios e fatores de crescimento (em monocamada e suspensão) e potencial tumorogênico.

3.3.1. Características morfológicas

A fig. 10 mostra o aspecto dos transfectantes B22 (v-fos), myc 9E e B47 (usados como protótipos) comparados com a linhagem parental Balb-3T3. Como ilustrado nesta figura, os transfectantes simples c-myc não diferem da linhagem parental enquanto os transfectantes simples v-fos têm um aspecto um pouco diferente e uma tendência a degeneração celular na ausência de extrato de plaqueta, mas é importante salientar que os dois transfectantes simples apresentam células achatadas que crescem até cobrir a superfície com uma monocamada. As células do duplo transfectante B47, porém, são afiladas e crescem desorganizadamente formando multicamadas. Portanto a expressão constitutiva de c-myc ou de v-fos não leva à chamada transforma-

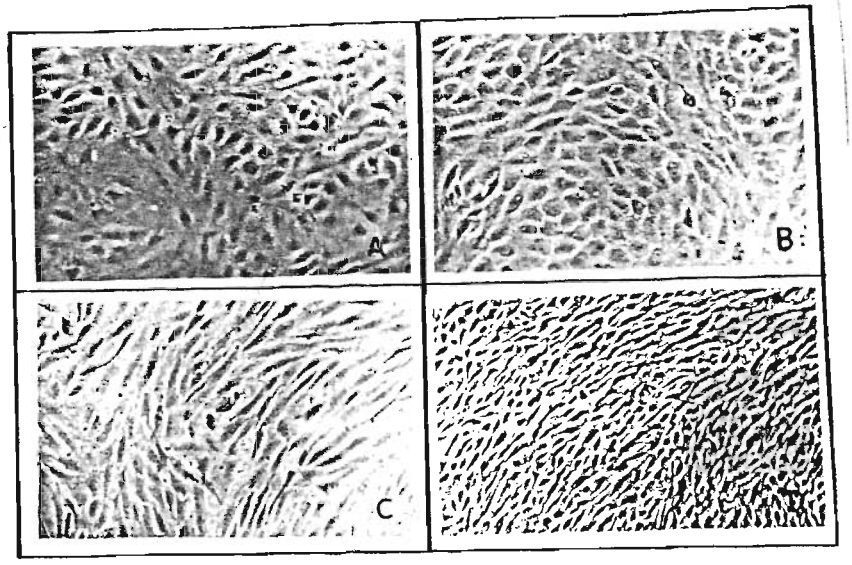

Fig. 10 Morfologia da célula Balb-3T3 parental (A) e seus transfectantes simples de v-fos (B) ou de c-myc (c) e duplo v-fos+c-myc (D) em meio contendo 10% soro.

ção morfológica de Balb-3T3. Mas a expressão constitutiva concomitante destes dois genes leva ao aparecimento de transformação morfológica, possivelmente por efeito cooperativo dos seus produtos.

3.3.2. Crescimento dos transfectantes em substrato sólido: efeito de hormônios e fatores de crescimento

Curvas de crescimento como as da fig. 11 mostram que o transfectante myc 9E que tem alta expressão constitutiva de myc, é dependente de fatores presentes no soro (e ausentes no plasma, como PDGF) o que confirma e estende dados anteriores nossos (Armelin et al, 1984). Como mostra a fig. 10 e conforme relatado na sessão 3.1, o transfectante B22 (v-fos) só cresce se além dos 10% de soro, o meio for complementado com extrato de plaqueta (que contém PDGF e outros fatores como TGF α e β). Sendo c-fos e c-myc induzíveis precocemente na ação mitogênica de PDGF, era importante verificar se a expressão constitutiva simultânea destes dois genes tornaria as células capazes de crescer no meio contendo plasma (pobre em PDGF) ao invés de soro. As curvas de crescimento para o transfectante duplo B47, mantido em soro e plasma na ausência e na presença de hidrocortisona, são comparadas com as curvas obtidas para a célula parental na fig. 12. Como se pode verificar, o crescimento de células B47 em plasma, apesar de maior do que da célula parental, ainda é subótimo mesmo na presença de hidrocortisona, mostrando que a expressão simultânea de fos e myc não permite superar a necessidade de PDGF no meio. Nesta fig. 12 ilustra-se também o efeito de

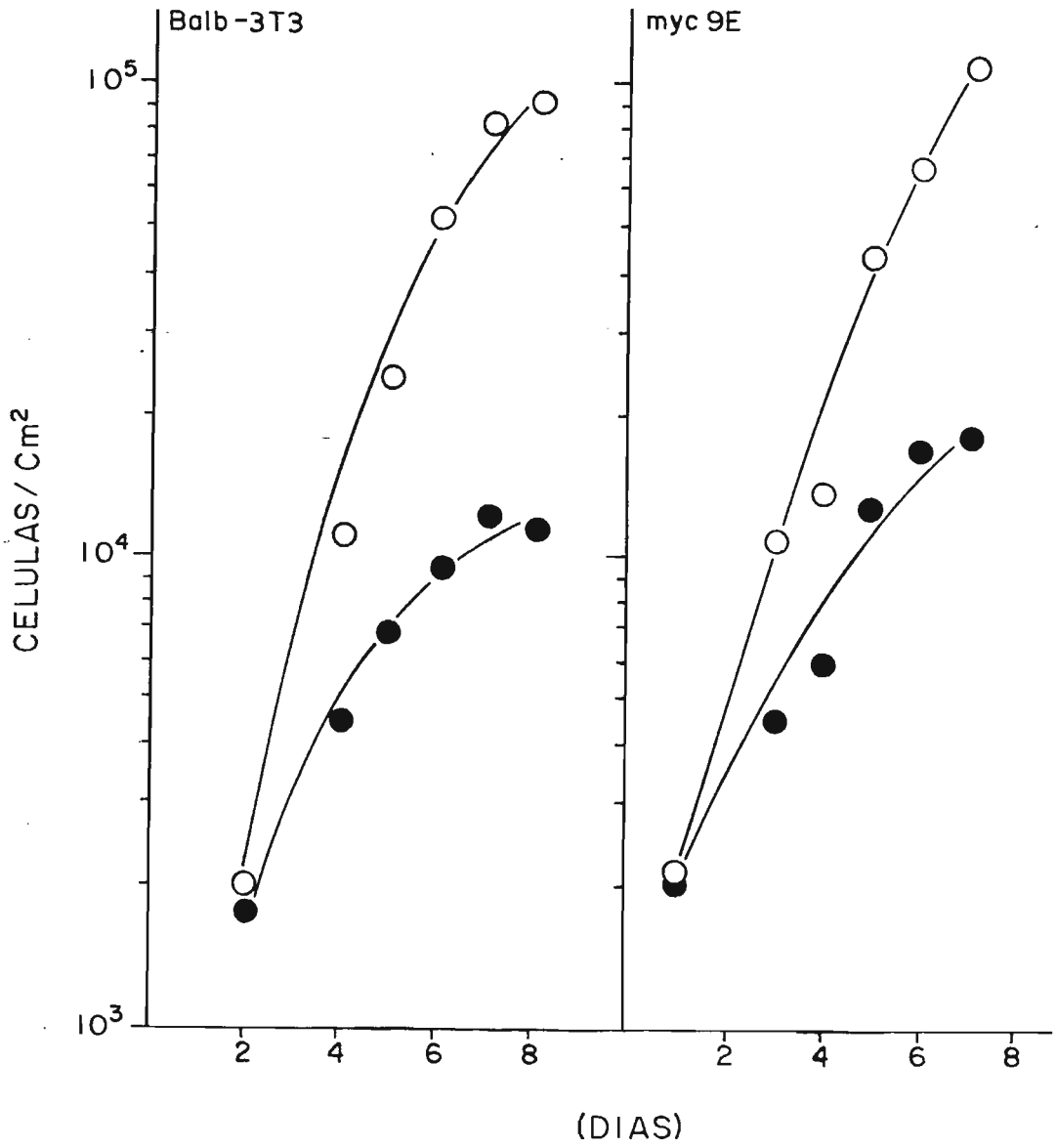

Fig. 11 Curvas de crescimento da linhagem parental Balb-3T3 (A) e da linhagem transfectante myc 9E em 10% soro (o—o) ou 10% plasma (●——●).

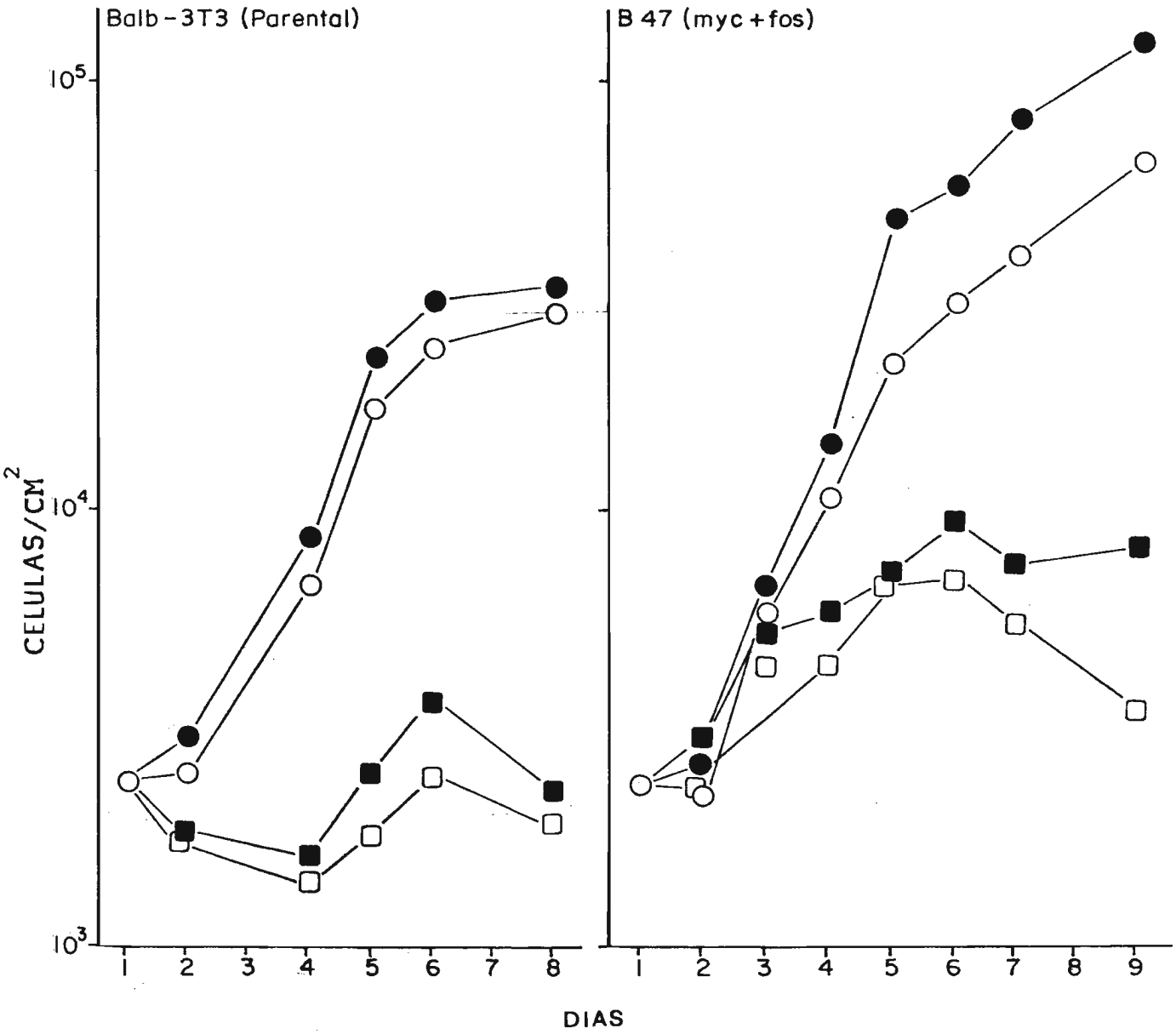

Fig. 12 Curvas de crescimento da linhagem parental Balb-3T3 (A) e do transfectante duplo B47 c-myc+v-fos (B) em 5% soro (o——o); 5% soro + hidrocortisona (●——●); 5% plasma (□——□) ou 5% plasma + hidrocortisona (■——■).

hidrocortisona no crescimento destas células. Ao contrário da célula parental que praticamente não é afetada por este hormônio, células B47 respondem a hidrocortisona (supostamente via ativação do promotor do MMTV-H3-myc exógeno) através de um aumento na velocidade de crescimento (TD passa de 21,6 a 15,6) e na densidade de saturação (D_s) que passa de $6,8 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^5$ céls/cm^2. A parental apresenta T_D de 24 h e D_s de 3×10^4 células/cm^2 independente da adição de hidrocortisona ao meio contendo 5% soro. Conclui-se, portanto, que a expressão de myc e fos não garantem crescimento ótimo em meio carente de PDGF, mas expressão elevada de c-myc acelera o crescimento (tanto em soro como em plasma).

O efeito de hormônios e fatores de crescimento foi analisado por medidas de: a) número de células após um período de crescimento ou b) tomada de timidina ^3H e determinação da % núcleos marcados ou de radioatividade incorporada em DNA.

Na fig. 13 mostra-se o crescimento do transfectante myc 9E em meio contendo 10% de plasma suplementado ou não com hidrocortisona, EGF e PDGF. Como pode ser visto, a célula parental não responde à hidrocortisona enquanto em myc 9E o efeito deste hormônio é limitado, mas significante. EGF tem um pequeno efeito na célula parental e um efeito dramático no transfectante myc 9E, mostrando que alta expressão constitutiva de myc sensibiliza as células a EGF, resultado publicado pela primeira vez por nós (Armelin et al., 1984) e confirmado por outros autores (Roberts et al, 1985; Balk et al, 1985; Stern et

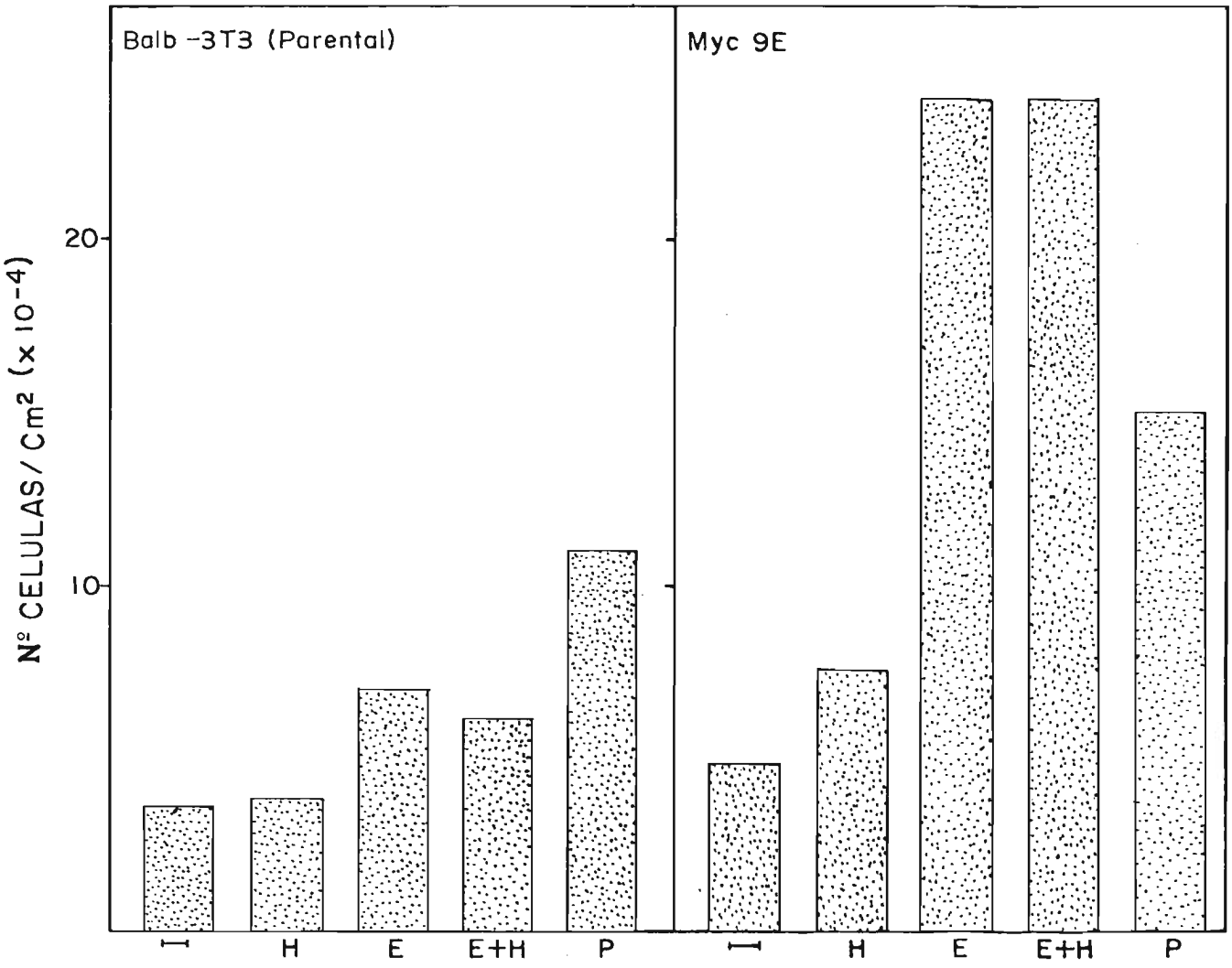

Fig. 13 Crescimento de células Balb-3T3 parentais e do transfectante myc 9E em 10% plasma-DME suplementado ou não com hidrocortisona (H), EGF (E) e PDGF (P).

al, 1986). Ambas, parental e myc 9E , respondem a PDGF corroborando os resultados da fig. 11. O crescimento do duplo transfectante em plasma é apresentado na Tabela VI. Suplementação deste meio com hidrocortisona acarreta em aumento de 2,5 vezes no número de células; insulina não tem efeito algum seja isoladamente ou em combinação com hidrocortisona.

Nas Tabelas VII e VIII mostra-se o efeito de hidrocortisona, insulina e FGF na entrada de células B47 confluentes na fase S (examinando-se apenas o primeiro ciclo de divisão celular). Pode-se verificar que, quando se submete culturas quasi-confluentes de B47 a carência de soro (Tabela VII), hidrocortisona e insulina têm um efeito razoável por si só (aumento de 2 a 3 vezes na % núcleos marcados) enquanto FGF aumenta de 6 vezes. Combinação de insulina e hidrocortisona resulta em moderado sinergismo. Por outro lado hidrocortisona e FGF têm um efeito sinergístico altíssimo (47 vêzes o basal). Deve-se notar, entretanto, que o sinergismo entre insulina e hidrocortisona é muito dependente da densidade celular, não ocorrendo em células B47 superconfluentes submetidas a meio contendo 5% de plasma (Tab. VIII).

Os dados apresentados na Tabela IX mostram que, ao contrário da célula parental, B47 não responde a EGF seja isoladamente ou em combinação com hidrocortisona, insulina ou ambos. Este resultado é oposto àquele encontrado para o transfectante myc 9E que se mostra super-responsivo a EGF.

Tabela VI: Crescimento do duplo transfectante B47 (myc + fos) em 5% plasma-DME suplementado ou não com hidrocortisona (100 ng/ml) e insulina (1 μg/ml).

Hormônio adicionado	No. de células/cm^2 (x 10^{-4}) no 5o. dia	No. Relativo de células*
-	2,0	1
Insulina	2,1	0,9 - 1,1
Hidrocortisona	4,8	2,4 - 2,6
Ins. + Hidroc.	4,6	2,5 - 2,7

* 3 experimentos independentes

No. de células no 1o. dia após o plaqueamento = 3 - 4 x 10^3 células/cm^2.

Tabela VII: Atividade mitogênica de hormônios (hidrocortisona, insulina) e fator de crescimento (FGF) em culturas confluentes de células B47 (myc + fos) carenciadas para soro.

Adição	% núcleos marcados
-	1,4
Hidrocortisona	3,3
Insulina	4,8
FGF	8,4
Hidroc. + Ins.	13,8
FGF + Ins.	66,0
Soro	96,0

Concentrações: H: 100 ng/ml

I: 1μg/ml;

FGF: 1 μg/ml

Soro: 10% FCS

Tabela VIII: Atividade Mitogênica de hormônios (hidrocortisona, insulina) e fator de crescimento (FGF) em culturas super-confluentes de células B47 (myc+fos) mantidas em 5% plasma-DME.

Adição	% núcleos marcados	
	Exp. 1	Exp. 2
—	0,5	0,3
Hidrocortisona	1,2	1,6
Insulina	1,5	1,2
Hidroc. + Ins.	1,0	0,8
FGF	-	50,0
Soro	93,0	—

Culturas mantidas até confluência em 12% FCS-DME, transferidas para 4% plasma-DME por 24 h e restimuladas por 24 h com incorporação de timidina-^{3}H nas últimas 12 h.

Concentrações: idem Tabela VII

Tabelas IX: Crescimento de células Balb-3T3 (parental) e B47 (duplo transfectante myc+fos) em 5%-plasma-DME suplementado ou não com hormônios (hidrocortisona, insulina) e/ou fator de crescimento (EGF).

Suplementação do meio	No. relativo de células/poço	
5% plasma-DME	Balb-3T3 (parental)	B47 (myc + fos)
-	1	1
Insulina	0,9	1
Hidrocortisona	0,9	2,4
EGF	2,7	1,3
Hidroc. + Ins.	0,9	2,3
Hidroc. + EGF	1,3	2,9
Ins. + EGF	1,7	0,8
Hidroc. + Ins. + EGF	0,8	2,7

Concentrações: idem Tabela VIII; EGF: 10 ng/ml.
Culturas mantidas em bandejas de 24 poços por 5 dias nos diferentes meios. Níveis basais (em 5% plasma-DME sem suplementação) correspondem a $1,9 \times 10^4$ e $2,3 \times 10^4$ células/poço para, respectivamente Balb-3T3 e B47.

3.3.3. Crescimento em suspensão de agarose: efeito de hormônios e fatores de crescimento

Dos inúmeros parâmetros de cultura de células, verifica-se que aquele que melhor correlaciona com o potencial tumorogênico (capacidade de induzir a formação de tumores sólidos quando injetadas em animais) é a formação de colônias em meio semi-sólido (metocel, agar, agarose). A análise dos transfectantes simples e duplos mostra que apenas os duplos transfectantes são capazes de crescer em suspensão. A Tabela X mostra que a eficiência de plaqueamento de B47 em 10% soro e 0.3% agarose é relativamente alta comparada com o transfectante B61 (EJ-ras) (respectivamente 17 e 29% das células plaqueadas formam colônias macroscópicas). Em meio contendo 10% plasma e 0,3% agarose, as células B47 têm um crescimento reduzido (eficiência de plaqueamento de 1-2% e colônias de tamanho bem menor). A busca de condições que permitissem crescimento de B47 em plasma levou aos resultados apresentados nas figs. 14 e 15 que podem ser resumidos da seguinte maneira: a) suplementação do meio apenas com hidrocortisona provoca um aumento no número de células/colônia e no número de colônias; b) EGF e insulina ou a combinação deles, não tem efeito algum; c) combinação de hidrocortisona com insulina permite obter a mesma eficiência de plaqueamento obtida em 10% soro; d) FGF, PDGF e TGF não têm efeito expressivo sobre o crescimento em suspensão; PDGF tem até um estranho efeito deletério em suspensão para o qual não se tem ainda uma explicação. Portanto, foi possível verificar que a expressão constitutiva concomitante de c-myc e v-fos torna as células (B47) independentes de

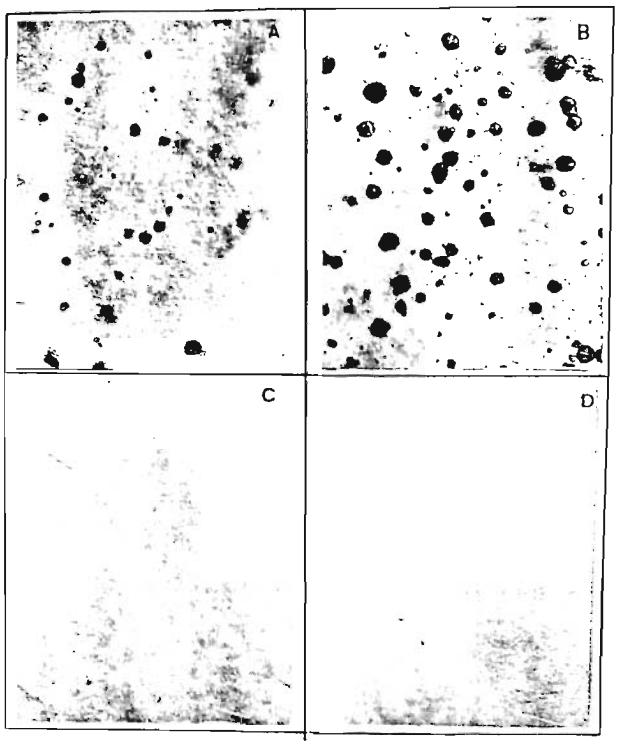

Fig. 14 Crescimento clonal em suspensão de agarose do transfectante duplo myc+fos B47 (A e B) e da linhagem parental Balb-3T3 (C e D) na ausência (A e C) e na presença de hidrocortisona (B e D).

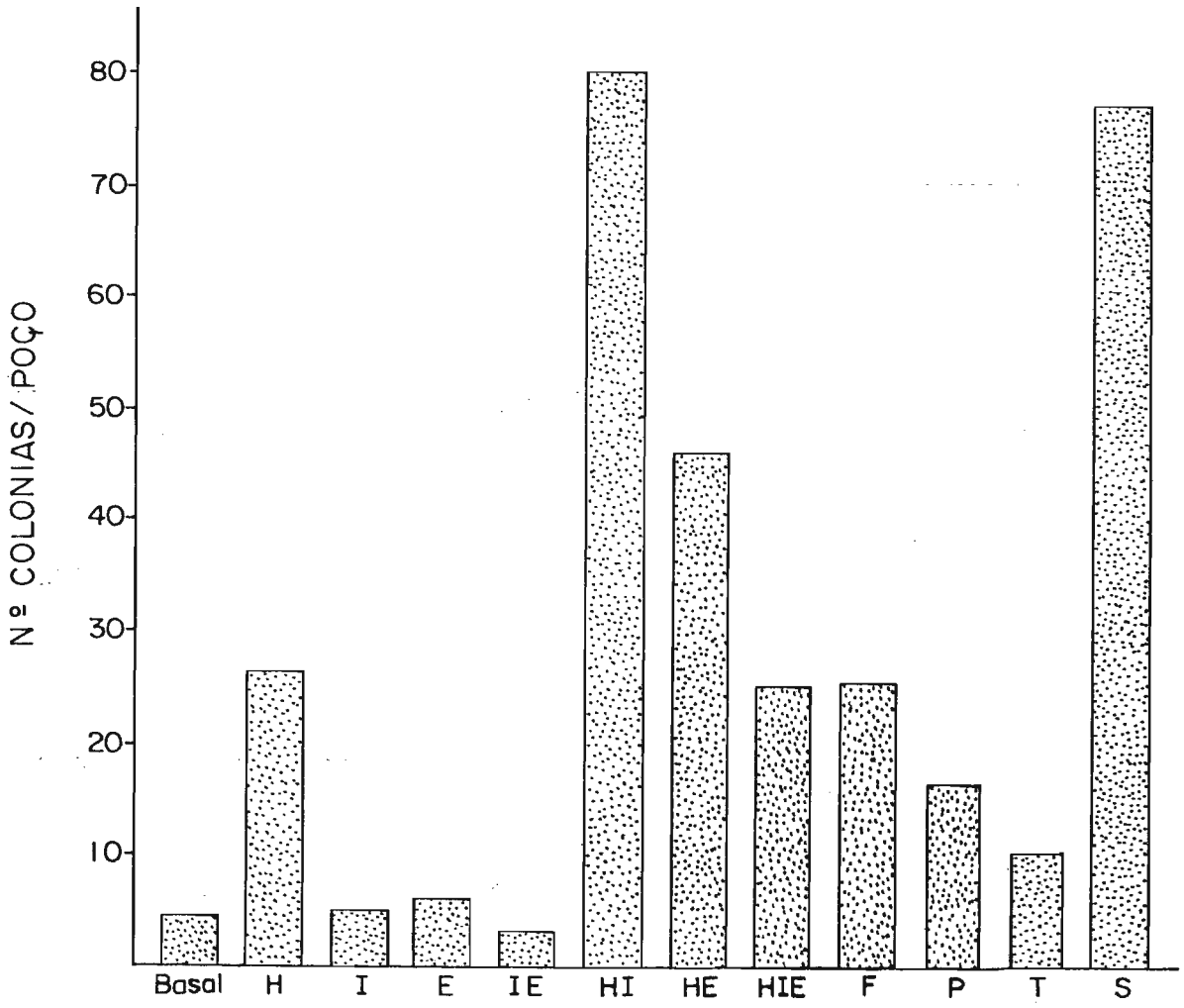

Fig. 15 Crescimento clonal em suspensão de agarose do transfectante duplo myc+fos B47 em 10% plasma-DME suplementado ou não com hidrocortisona (H); insulina (I); EGF (E); FGF (F); PDGF (P); TGF (T) ou 10% soro fetal bovino (S). Inóculo: 500 células/poço.

Tabela X: Eficiência de Plaqueamento em suspensão de agarose.

Linhagem celular	No. colônias/poço	Eficiência de plaqueamento (%)
Balb-3T3 (Parental)	zero	zero
B47 (*myc* + *fos*)	33,5 (8,5)	17
B61 (*EJ-ras*)	57 (4,5)	29

200 células/poço plaqueadas em 10% FCS-DME. Colônias contadas aos 20 dias (duplicatas).

fatores de competência (FGF, PDGF) para crescimento em suspensão, mas não para crescimento em substrato sólido.

3.3.4. Medidas do potencial tumorogênico dos transfectantes

Como mencionado no item anterior, a capacidade de formar colônias em suspensão correlaciona bastante bem com a capacidade de induzir a formação de tumores em animais. A alta eficiência de plaqueamento de B47 em suspensão de agarose, levou-nos a verificar se eram capazes de induzir a formação de tumores em camundongos tratados ou não com dexametasona (para otimizar a expressão de c-myc exógeno em B47).

Os resultados encontram-se na Tabela XI. Como se pode verificar, em condições em que o transfectante de EJ-ras induz tumor em quase 100% dos animais injetados, B47 não é capaz de induzir a formação de tumores ou causar nenhuma alteração anatomo-patológica visível, seja em animais tratados com dexametasona ou não tratados. Alguns destes animais foram acompanhados por 6 meses sem alteração.

Conclui-se então que apesar da expressão constitutiva concomitante de c-myc e v-fos permitir o crescimento em suspensão, ela não torna as células tumorogênicas.

Tabela XI: Ensaio de tumorogenicidade de células Balb-3T3 (parental); B47 (transfectante duplo myc-fos) e B61 (transfectante de EJ-ras).

Linhagem Infectada	Tipo de Animal injetado	Tratamento c/ dexametasona	No. animais com tumor/ No. animais infectados
Balb-3T3 (parental)	Nude	-	0/4
	Nude	+	0/4
	Normal	-	0/3
B47 (myc + fos)	Nude	-	0/8
	Nude	+	0/7
	Normal	-	0/2
B61 (EJ-ras)	Nude	-	7/8

20 dias após as injeções os animais injetados com B61 já apresentaram tumores volumosos e foram sacrificados. Os demais animais que não desenvolveram tumores foram acompanhados por 3 (e alguns por 6) meses sem nenhuma indicação de tumor.

Dexametasona: 5 μg/animal a cada 3 dias.

DISCUSSÃO

O estudo do controle da proliferação celular foi possibilitado pelo desenvolvimento da cultura de células "in vitro", um marco decisivo na sua evolução tendo sido o isolamento da linhagem 3T3 (Aaronson & Todaro,1968). Conforme discutido extensamente em Armelin & Armelin (1986) esta linhagem constitui-se num excelente paradigma de células normais, pois tem seu crescimento fortemente regulado por efetuadores extracelulares.

A entrada de células Balb-3T3 no ciclo celular (transição G0/G1) é desencadeada por uma classe de fatores de crescimento, os fatores de competência (FGF, PDGF).

Os protooncogenes c-myc e c-fos são precocemente induzidos na ação de fatores de competência (Kelly et al, 1983; Greenberg & Ziff, 1984; Müller et al, 1984; Cochran et al, 1984; Kruijer et al, 1984). Um destes protooncogenes (c-myc) foi apontado como um possível mediador intracelular do sinal mitogênico dado por PDGF (Armelin et al, 1984) uma vez que a expressão constitutiva deste gene abole parcialmente o requerimento para PDGF no meio de cultura.

O fato da expressão de c-fos preceder a de c-myc na ação de PDGF, motivou a idéia de que o produto de c-fos agisse, em trans, como promotor da transcrição de c-myc. Esta questão foi atacada por Greenberg et al (1986) usando inibidores de síntese protêica, mas os próprios autores concluíram que a questão continua em aberto. Os resultados descritos nesta tese trazem uma contribuição para esta questão: no duplo transfectante B47

convivem uma alta expressão constitutiva do v-fos ao lado de uma baixa expressão do c-myc endógeno (note-se que o c-myc exógeno praticamente não é detectável a não ser quando induzido com hidrocortisoma). Estes resultados mostram que a alta expressão de fos não leva necessariamente à indução de myc e sugerem que o produto de fos (induzido precocemente por PDGF) não é o responsável direto pela onda de expressão de myc que ocorre 1 a 2 horas depois.

Flutuações nos níveis de myc e fos têm sido associadas com os processos de divisão e diferenciação celular. Trabalhos recentes (revistos em Müller, 1986 e Armelin & Armelin, 1986) apontam para correlações de alto nível de myc com programa proliferativo e alto nível de fos com diferenciação celular, entretanto o quadro está apenas começando a ser esboçado.

Evidências de que alta expressão de myc sinaliza divisão celular são: a) myc é induzível, em fibroblastos, por fatores de crescimento (PDGF, FGF, EGF) e em linfócitos por agentes mitogênicos (LPS, lectinas, etc) (Kelly at al, 1983; Greenberg & Ziff, 1984; Müller et al, 1984; Kruijer et al, 1984) mas Bravo et al (1985) mostraram que tanto as células parentais A431 (que são inibidas por EGF) como variantes resistentes a EGF têm myc e fos induzido com idêntico padrão; b) alta expressão de myc alivia o requerimento de PDGF no meio de cultura (Armelin et al, 1984) e induz divisão celular quando microinjetado (Kaczmarek et al, 1985); c) myc é induzido na regeneração de fígado que ocorre após hepatectomia parcial (Makino et al, 1984) e na proliferação de macrófagos induzida por M-CSF, o fator de crescimento destas

células (Müller et al, 1985); d) alta expressão de myc é encontrada em células quimicamente transformadas, em linfomas, leucemias e alguns tipos de carcinoma (Campisi et al, 1984) e aumenta a expectativa de duração de culturas primárias de camundongo, daí myc ter sido classificado como um oncogene imortalizante (Land et al, 1983; Ruley, 1983). Trabalhos recentes (Goudeau et al, 1986; Taylor et al, 1986) mostram que na segmentação do ovo de anfíbios (Xenopus) onde o ciclo celular é muito curto (minutos) e não corresponde às fases do ciclo celular no adulto (horas) a expressão de myc não correlaciona com a velocidade da divisão celular. Há indicações também de que diminuição da expressão de myc sinaliza diferenciação celular (Reistma et al, 1983; Jonak & Knight, 1984; Einat et al, 1985; Muller et al, 1985; Prochuwinick et al, 1986; Dmitrovsky et al, 1986).

O produto de fos tem sido associado tanto com crescimento como com diferenciação. Dois argumentos fortes para o envolvimento deste oncogene com proliferação são: a) expressão de fos é induzida por fatores de crescimento; vale aqui, porém a mesma ressalva feita para myc (Bravo et al, 1985); b) bloqueio.da expressão de fos, através de um anti-mensageiro, leva a inibição da divisão celular (Holt et al, 1986). Duas linhas de investigação implicam fos na diferenciação: medidas da expressão deste gene em sistemas que estão diferenciando sob ação de algum agente e diferenciação induzida por transfecção de fos. Assim, alta expressão de fos foi encontrada para diversas linhagens do sistema hemopoiético que diferenciam sob ação de agente viral

(FLV-Friend Leukemia Virus); químico ou bioquímico (promotor de tumor TPA, dimetilsulfóxido, derivados de vitamina D, interferon, NGF-fator de crescimento de nervo) (Gonda & Metcalf, 1984; Müller et al, 1984; 1985; Mitchell et al, 1985; Greenberg et al, 1985; Kruijer et al, 1985; Conscience et al, 1986). A introdução de v-fos em células F9 de teratocarcinoma leva à diferenciação destas células (Müller et al, 1984). Mas a correlação não é perfeita e um exemplo disto é o fato de fos ser induzido por EGF (e por FGF e PDGF também) em células cromafínicas PC12, mas não induzir diferenciação (enquanto FGF induz ambos fos e diferenciação) (Togari et al, 1985; Wagner & D'Amore, 1986). Além disso Mitchell e cols. (1986) mostraram que a expressão de c-fos não é nem suficiente nem necessária para uma linhagem do sistema hemopoiético diferenciar em macrófagos.

Os dados referidos acima, outros da literatura e nossos próprios resultados sugerem que a expressão ou não dos protooncogenes myc e fos e as relações quantitativas entre: o produto destes genes e deles com outros produtos gênicos, constituem-se nos sinais moleculares que determinam o caminho que as células vão seguir nos processos de ontogênese e morfogênese dos tecidos.

Para estudar o papel dos oncogenes myc e fos e da interação entre eles na ação mitogênica de PDGF e na transformação maligna construímos transfectantes simples e duplos (expressando apenas um ou ambos os genes) de células Balb-3T3. Adotou-se cotransfecção destes genes com o transposon Tn5 bacteriano para garantir uma seleção neutra, baseada exclusivamente na resistência a geneticina G418 (conferida pelo Tn5). O racional destes

experimentos baseia-se em atribuir, a um determinado produto gênico, um papel na ação de PDGF, se a presença contínua deste produto na célula eliminar (total ou parcialmente) a necessidade de se adicionar PDGF ao meio de cultura.

Os transfectantes simples de myc foram obtidos (Armelin, 1984) por introdução do plasmídio MMTV-H3-myc no qual o proto-oncogene de camundongo é dirigido pelo promotor de MMTV, o qual é induzível por glucocorticóides. O plasmídio p FBJ-2 foi escolhido para gerar os transfectantes de fos por ter v-fos sob a ação de um promotor viral forte. Para nossa surpresa, a expressão constitutiva de v-fos nos transfectantes simples levou a alterações morfológicas que lembram células que estão em crise (de senescência) ou em processo de diferenciação terminal. Este efeito pode ser contrabalançado por adição de extrato de plaqueta ao meio ou por cotransfecção de myc e fos. Estes dados apoiam a hipótese de envolvimento destes genes na decisão: dividir ou diferenciar .

O papel de myc e fos na transformação maligna foi atacado diretamente. Verificou-se que a expressão constitutiva de myc ou de fos não acarreta em transformação morfológica nem torna as células tumorogênicas. Já a expressão constitutiva concomitante de myc e fos leva à transformação morfológica e aquisição da capacidade de crescer em suspensão mas não à malignidade pois as células continuam sendo incapazes de induzir a formação de tumor quando injetadas. Portanto, ou estes genes não estão envolvidos nos processos que levam à tumorogênese ou outros produtos gênicos são necessários para complementar a ação deles.

Cooperação entre produtos de oncogenes no estabelecimento da transformação maligna tem sido relatada na literatura (Ruley, 1983; Land et al, 1983; 1986; Vogt et al, 1986; Cleveland et al, 1986). Estudos de complementação levaram Weinberg & cols. (Land et al, 1983; 1986; Parada et al, 1984 e Ruley, 1983) a conclusão de que 2 oncogenes são necessários para a transformação neoplásica e a propor uma classificação dos oncogenes em 2 classes: a) imortalizantes (myc, ElA, PyLT); b) transformantes (ras, ElB, PyMT e vários outros). Propusemos uma interpretação alternativa (Armelin & Armelin, 1986) na qual produtos de oncogenes seriam os reguladores naturais do ciclo celular com alterações na composição e/ou relação estequiométrica entre eles podendo levar tanto a imortalização como a transformação neoplásica. De fato diversos trabalhos recentes mostram que, dependendo das condições, o mesmo produto gênico pode atuar em imortalização e senescência conforme mostrado para myc e ras (Land et al, 1986; Spandidos & Wilkie, 1984; Vennstrom et al, 1985; Keath et al, 1984) e para fos (Jenuwein et al, 1985). Da mesma forma $p21^{ras}$, associada até recentemente apenas com transformação maligna, desencadeia divisão celular quando injetada em fibroblastos (Stacey & Kung, 1984; Feramisco et al, 1984; Mulcahy et al, 1985) e diferenciação quando microinjetada em células cromafínicas PC12 levando-as à formação de prolongamentos nervosos (Bar-Sagi & Feramisco, 1985).

No caso de fos é importante lembrar que existem 2 retrovírus que carregam fos: FBJ-MSV que codifica para $p55^{fos}$ e FBR-MSV que codifica para uma proteína de fusão $p75^{gag-fos}$. Além disso FBR-MSV contém ainda uma sequência (fox) considerada oncogênica

também.

O grupo de Müller (Jenuwein et al, 1985; Müller, 1986) estudou a participação do oncogene fos na imortalização e transformação de fibroblastos de camundongo (MEF, cultura primária) através de infecção viral (FBJ ou FBR) e de transfecção com plasmídios recombinantes carregando os v-oncs de cada vírus. Estes autores verificaram que: a) plasmídios recombinantes contendo o gene neo e os provírus de FBR ou de FBJ permitem a formação de colônias $G418^r$, mas as colônias provenientes de FBR podem ser subcultivadas indefinidamente enquanto as de FBJ senescem; b) tanto vírus como o recombinante de FBR transformam as MEF dando focos característicos; c) o recombinante de FBJ não transforma e o vírus FBJ só transforma se a infecção for feita simultaneamente com um vírus "helper", MuLV. Nosso resultados concordam com estes uma vez que mostramos que fos de FBJ leva a alterações morfológicas (senescência ou diferenciação) mas não a transformação maligna. Além disso verificamos que pFBJ-2 não induz a formação de focos em Balb-3T3 enquanto uma construção de FBR (pFBR-1) forma claros focos na mesma célula (resultados não publicados).

Apesar das diferenças entre as sequências de FBJ-fos e FBR-fos e entre seus produtos gênicos (van Beveren et al, 1983; 1984; Verma, 1986) é muito provável que o oncogene fox esteja influenciando a atividade biológica de fos no FBR.

A análise comparativa dos transfectantes simples e duplos com relação aos requerimentos de hormônios e fatores de crescimento tanto em monocamada como em suspensão permitiu obter

informações importantes sobre o papel dos produtos de myc e fos na ação mitogênica de PDGF.

Utilizando o critério de independência em relação a PDGF, verificou-se que a expressão constitutiva concomitante de myc e fos confere às células independência de PDGF para crescimento em suspensão, mas não em monocamada. As interações da célula com o substrato de apoio e a organização do complexo superfície celular-membrana-citoesqueleto desempenham importante papel no controle da divisão celular. Uma demonstração elegante disto é dada pelos trabalhos de Folkman & Moscona (1978; Salomon et al 1981; O'Neil, 1979, 1986). Aliando o enfoque bioquímico à utilização de mutantes regulatórios da linhagem C_6 de glioma de rato chegamos a conclusão que hormônios glucocorticóides atuam diferencialmente sobre a proliferação destas células dependendo delas estarem aderidas à superfície ou em suspensão (Armelin & Armelin, 1983). O duplo transfectante B47 (myc+fos) entra em repouso quando mantido em monocamada e meio contendo plasma. Por outro lado, em suspensão de agarose, suplementação do meio contendo 10% plasma apenas com hidrocortisona (que garante alta expressão de myc) e insulina (que atua como os fatores de progressão IGFs) permite crescimento máximo, dispensando, portanto, a presença de PDGF. Estes resultados mostraram claramente que os produtos de myc e fos podem ser os únicos mediadores intracelulares de PDGF para crescimento em suspensão, mas certamente outros produtos gênicos (induzíveis ou não por fatores de crescimento) estão envolvidos na ação deste fator de competência para crescimento em monocamada. É preciso

distinguir então, entre os genes de competência, aqueles relacionados apenas com crescimento em substrato sólido porque seus produtos devem participar da transdução do sinal mitogênico de PDGF através de uma rede altamente organizada de fibras (superfície celular/citoesqueleto) a qual não está presente em células em suspensão.

Verificou-se que hidrocortisona estimula a proliferação de B47 tanto em monocamada como em suspensão. Este resultado confirma e estende dados anteriores (Armelin et al 1984) que implicam myc no processo de divisão celular.

O efeito conjunto de hidrocortisona e insulina também foi diferente em monocamada e suspensão: um sinergismo moderado e dependente da densidade foi observado para B47 crescendo em substrato sólido; enquanto sinergismo acentuado (quase 50 vêzes) ocorre em suspensão. Estes resultados mostram novamente que a expressão de myc e fos torna as células totalmente competentes para crescimento em suspensão (exigindo especificamente os fatores de progressão IGFs mas não EGF) enquanto para monocamada outros mediadores intracelulares são necessários. Uma contraprova disto é o alto sinergismo observado entre hidrocortisona e FGF (fator de competência que desencadeia a expressão de um conjunto de genes).

Mostramos pela primeira vez (Armelin et al, 1984) e outros autores confirmaram (Roberts et al, 1985; Balk et al, 1985; Sorrentino et al, 1986) que a alta expressão de myc sensibiliza as células a EGF. Ao contrário dos IGFs , EGF não pode ser classificado estritamente como fator de progressão uma vez que :

a) tem um certo potencial mitogênico na ausência de outros fatores (Carpenter & Cohen, 1979; Liboi et al, 1986); b) induz a expressão de c-fos e c-myc embora em menor extensão que os fatores de competência PDGF e FGF (Müller et al, 1984; Bravo et al, 1985). Um resultado totalmente inesperado foi de que o duplo transfectante B47 não só é sensibilizado como até perdeu a resposta a EGF. Não se tem elementos para fazer afirmações sobre as possíveis causas para isto - se é devido a perda de receptores na membrana ou a algum mediador intracelular de sua ação.

O efeito dos oncogenes myc e fos na ação mitogênica de PDGF e no estabelecimento da transformação maligna foi estudado através da geração de mutantes de células Balb-3T3 por cotransfecção de v-fos e c-myc e um marcador genético (neo) que permite seleção dos transfectantes por resistência a geneticina G418. A análise dos transfectantes simples (c-myc ou v-fos) e duplos (c-myc+v-fos) permitiu chegar as seguintes conclusões:

1) Indução da expressão de myc leva a aumento da proliferação celular.

2) Alta expressão de v-fos não induz a expressão de c-myc; portanto o pico de fos que precede o pico de myc na ação de PDGF não deve ser atribuído a uma relação causa - efeito.

3) A expressão de v-fos não leva à transformação de Balb-3T3 mas sim à morte celular (senescência/diferenciação).

4) Os produtos de c-myc e c-fos são componentes do sistema de transdução do sinal mitogênico de PDGF pois abolem parcialmente o requerimento de PDGF para crescimento em substrato sólido e totalmente para crescimento em suspensão.

5) A expressão concomitante de c-myc e v-fos garante crescimento ótimo em suspensão apenas na presença de fatores de progressão IGFs.

6) Alta expressão de c-myc e v-fos não determinam potencial tumorogênico, embora leve a transformação morfológica e capacidade de crescer em suspensão.

REFERÊNCIAS

AARONSON, S.A. & TODARO, G. (1968) - Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. Science 162: 1024-1026.

ABRAHAM, J.A.; MERGIA, A.; WHANG, J.A.; TUMOLO, A.; FRIEDMAN, J.; HJERRILD, K.A.; GOSPODAROWICZ, D. & FIDDES, J.C. (1986a) - Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. Science 233: 545-548.

ABRAHAM, J.A.; WANG, J.L.; TUMOLO, A.; MERGIA, A.; FRIEDMAN, J.; GOSPODAROWICZ, D. & FIDDES, J.C. (1986b) - Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization EMBO J. 5 (10): 2523-2528.

ACRES, R.B.; LAMB, J.R. & FELDMAN, M. (1985) - Effects of platelet - derived growth factor and epidermal growth factor on antigen-induced proliferation of human T-cell lines. Immunology 54: 9-16.

ANTONIADES, H.N.; SCHER, C.D. & STILES, C.D. (1979) - Purification of the human platelet-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1809-1813. a

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

ARMELIN, H.A. (1975) - Hormones and regulation of cell division: mammalian cell cultures as an experimental approach. In G. Litwack, Ed., Biochemical Actions of Hormones. Academic Press, New York, 3: 1-21.

ARMELIN, H.A. & ARMELIN, M.C.S. (1986) - Oncogenes, genes and growth factors. G. Guroff, ed. John Wiley & Sons, Inc.

ARMELIN, H.A.; ARMELIN, M.C.S.; KELLY, K.; STEWART, T., LEDER, P.; COCKRAN, B.H. & STILES, C.D. (1984) - Functional role for c-myc in mitogenic response to PDGF. Nature 310: 655-660.

ARMELIN, M.C.S. & ARMELIN, H.A. (1983) - Glucorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. J. Cell Biol. 97: 459-465.

ARMELIN, M.C.S.; GAMBARINI, A.G. & ARMELIN, H.A. (1977) - On the regulation of DNA synthesis in a line of adrenocorticol tumor cells : effects of serum, adrenocorticotropin and pituiratary factors. J.Cell. Physiol. 93: 1-10.

ARMELIN, M.C.S.; ARMELIN, H.A.; CALLAHAN, M.A.; COCHRAN, B.H. & STILES, C.D. (1985) - New tactics for analysis of oncogenes in Cancer Cells 3: 195-203, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

BACCHETTI, S. & GRAHAM, F.L. (1977) - Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:1590-1594.

BAIRD, A.; ESCH, F.; LING, N. & GOSPODAROWICZ, D. (1985a) - Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from the bovine kidney: homology with basic fibroblast growth factor. Regul. Peptides 12:201-213.

BAIRD, A; ESCH, F.; GOSPODAROWICZ, D & GUILLEMIN, R. (1985b) - Retina derived endothelial cell growth factors: molecular characterization identity with acidic and basic fibroblast growth factor. Biochemistry 24: 7855-7859.

BAIRD, A.; NORMEDE, P. & BOHLEN, P. (1985c) - Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggest its identity with macrophage derived growth factor. Biochem.Biophys. Res. Commun. 16: 358-364.

BALK, S.D. (1971) - Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed chicken fibroblast in a plasma-containing medium. Proc. Nac.Acad. Sci. USA 68: 271-275.

BALK, S.D.; RILEY, T.M.; GUNTHER, H.S. & HORISI, A. (1985) - Heparin-treated, v-myc-transformed chicken heart mesenchymal cells, assume a normal morphology but are hypersensitive to EGF and brain fibroblast growth factor (bFGF): cells transformed by the v-Ha-ras oncogene are refractory to EGF and bFGF but are not to IGF. Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 82: 5781-5785.

BAR-SAGI, D. & FERAMISCO, J.R. (1985) - Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. Celll 42: 841-848.

BERK, B.C.; ALEXANDER, R.W.; BROCK, T.A.; GIMBRONE, M.A. & WEBB, C.R. (1986) - Vasoconstriction: a new activity for platelet-derived growth factor. Science, 232, 393-405.

BERRIDGE, M.J. & IRVINE, R.F. (1984) - Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature, 312: 315-321.

BETSHOLIZ, C.; HELDIN, C.H.; NISTER, N.; E.K., B; WASTERSON, A. & WESTERMARK, B. (1983) - Synthesis of a PDGF-like growth factor in human glioma and sarcoma cells suggests the expression of the celular homologue to the transforming protein of simian sarcoma virus. Biochem.Bioph.Res.Comm. 117: 176-182.

BETSHOLTZ, C.; WESTERMARK, B.; EK, B. & HELDIN, C.H. (1984) Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implications for autocrine receptor activation. Cell 39: 447-457.

BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J. (1979) - A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1518.

BISHOP, J.M. (1978) - Retroviruses. Ann.Rev.Biochem. 47: 35-88.

BISHOP, J.M. (1981) - Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. Cell 23, 5-6.

BISHOP, J.M. & VARMUS, H.E. (1982) - Functions and origins of retroviral transforming genes. In molecular Biology of Tumor Viruses, Part III - RNA Tumor viruses, R.Weiss, N. Teich, H. Varmus and J. Coffin. eds (New York: Cold Spring Harbor Press). pag. 999 - 1108.

BISHOP, J.M. (1983) - Cellular oncogenes and retroviroses. Ann.Rev.Biochem. 52, 301-354.

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

BITTNER, J.J. (1942) - The milk-influence of breast tumors in mice. Science, 95: 462-3

BOCKUS, B.J. & STILES, C.D. (1984) - Regulation of cystoskeletal architecture by platelet-derived growth factory, insulin and epidermal growth factor. Experimental Cell Research, 153: 186-197.

BOHLEN, P.; BAIRD, A.; ESCH, F.; LING, N. & GOSPODAROVICZ, D. (1984) - Partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 81: 5364-5368.

BOHLEN, P.; ESCH, F.; BAIRD, A. & GODOSPODAROVICZ, D. (1985) - Aminoterminal sequence and comparison to basic fibroblast growth factor. EMBO J. 4: 1951-1956.

BOWEN-POPE, D.F.; VOGEL, A. & ROSS, R. (1984) - Production of platelet-derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors acoompany transformation by a wide spectrum of agents. Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 81: 2396.

BRAVO, R.; BURCKHARDT, J.; CURRAN, T. & MULLER, R. (1985) - Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A431 cell clones is accompanied by the rapid induction of c-fos and c-myc proto-oncogenes. EMBO J. 4: 1193-1197.

BRIGHT, M.D. & GAFFNEY, E.V. (1982) - Demonstration of competence and progression activities for human fibroblast. Exp. Cell Res. 137: 309-316.

BRUGGE, J.S., & ERIKSON, R.L. (1977) - Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. Nature, 269: 346-8.

BRUGGE, J.S.; COLLET, M.S.; SIDDIQUI, B.; MARCZYNKA, B.; DEINHARDT, F. & ERIKSON, R.L. (1979) - Detection of the viral sarcoma gene product in cells infected with various strains of avian sarcoma virus and of a related protein in uninfected chicken cells. J. Virol. 29: 1196-1203.

CAMPISI, J.; GRAY, H.E.; PARDEE, A.B.; DEAN, M. & SONENSHEIN, G.E. (1984) - Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. Cell, 36, 241-247.

CARPENTER, G.; COHEN, S. (1979) - Epidermal growth factor. Ann.Rev.Biochem. 48: 193-216.

CHIRGWIN, J.; AEYBLE, A.; McDONALD, R. & RUTLER, W. (1979) - Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochem. 8: 5294-5299.

CLEMMONS, D.R.; UNDERWOOD, L.E. & VAN WYK, J.J. (1981) - Hormonal control of immunoreactive somatomedin production by cultured human fibroblasts. J. Clin.Invest. 67: 10-19.

CLEVELAND, J.L.; JANSEN, H.W.; BISTER, K.; FREDRICKSON, T.N., MORSE III, H.C.; IHLE, J.N. & RAPP, U.K. (1986) - Interaction between raf and myc oncogenes in transformation in vivo and in vitro. J.Cell.Biochem. 30: 195-218.

COCHRAN, B.H.; LILLQUIST, J.S. & STILES, C.D. (1981) - Post-transcripitional control of protein synthesis in Balb/c 3T3 cells by PDGF and pratelet-poor plasma. J.Cell.Physiol. 109: 429-438.

COCHRAN, B.H.; REFFEL, A.C. & STILES, C.D. (1983) - Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet derived growth factor. Cell 33, 939-947.

COCHRAN, B.H.; ZULLO, J.; VERMA, I.M. & STILES, C.D. (1984) - Expression of the c-fos gene and a fos-related gene is stimulated by platelet derived growth factor. Science 226: 1080-1082.

COFFIN, J.M.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M.; ESSEX, M.; HARDY, W.D.; MARTIN, G.S.; RESENBERG, N.E.; SCOLNICK, E.M.; WEINBERG, R.A. & VOGT, P.K. (1981) - Proposal for naming host cell-derived inserts in retrovirus genomes. Journal of Virology 953-957.

COHEN, S.J. (1962) - Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. J.Biol.Chem. 237: 1555-1562.

COLLETT, M.S., & ERIKSON, R.L. (1978) - Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. PNAS, 75: 2021-4

CONSCIENCE, J.F.; VERRIER, B. & MARTIN, G. (1986) - Interleukin-3 dependent expression of the c-myc and c-fos protooncogenes in hemopoietic cell lines. EMBO J. 5: 317-323.

COOPER, J.A., BOWEN-POPE, D.F.; RAINES, E.; ROSS, R. & HUNTER, T. (1982) - Similar effects of PDGF and EGF on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. Cell 31: 263-273.

COOPER, G.M.; GOUBIN, G.; DIAMOND, A. & NEIMAN, P. (1986) - Relationship of blym genes to repeated sequences. Nature, 320: 579.

CURRAN, T.; PETERS, G.; van BEVEREN, C.; TEICH, N. & VERMA, I. (1982) - FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. J.Virol. 44: 674-682.

DAINIAK, N.; DAVIES, G.; KALMARTI, M.; LAWLER, J. & KULKARNI, V. (1983) - Plateled-derived growth factor promotes the proliferation of erythropoietic progenitor cells in vitro. J.Clin.Inves. 71: 1206-1214.

DER, C.; KRONTIRIS, T., & COOPER, G. (1982) - Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. PNAS-USA, 79: 3637-40.

DEVARE, S.G.; REDDY, E.P.; LAW, J.D.; ROBBINS, K.C. & AARONSON, S.A. (1983) - Nucleotide sequence of the simian sarcoma virus genome: Demonstration that its aquired cellular sequences encode the transforming gene product p28sis. Proc. Natl.Acad.Sci USA, 80: 731-735.

DICKER, P.; POHJANPELTO, P.; PETTICAN, P. & ROZENGURT, E. (1981)- Similarities between fibroblast-derived growth factor and platelet-derived factor. Exp. Cell. 135: 221-227.

DMITROOSKY, E.; KUEHL, W.M.; HOLLIS, G.F.; KIRSCH, E.R.; BENDER, T.P. & SEGAL, S. (1986) - Expression of a transfected human c-myc oncogene inhibits differentiation of a mouse erythroleukemia cell line. Nature, 322, 748-750.

DOOLITTLE, R.F.; HUNKAPILLER, M. W.; HOOD, L.E.; DEVARE, S.G.; ROBBINS, K.C.; AARONSON, S.A. & ANTONIADES, H.N. (1983) - Simian sarcoma virus oncogene, v-sis, is derived from the gene (or genes) enconding a platelet-derived growth factor. Science 22: 275-276.

DOUNWARD, J.Y.; MAYES, Y., SCRACE, G.; TOTTY, N.; STOCKWELL, P.; ULRICH, A.; SCHLESSINGER, J. & WATERFIELD, M.D. (1984) - Close similarity of EGF-receptor and V-erb-B oncogene protein sequences. Nature, 307: 521-527.

DUESBERG, P.H. (1983) - Retroviral transforming genes in normal cells? Nature, 304: 219-226.

DUESBERG, P.H. & VOGT, P.K. (1970) - Differences between the ribonucleic acids of transforming and non transforming avian tumor viruses. PNAS.USA, 67: 1673-1680.

DUESBERG, P.H. & VOGT, P.K. (1973) - RNA species obtained from clonal lines of avian sarcoma and from avian leukosis virus. Virology, 54: 207-219.

EINAT, M.; RESNITZKY, D. & KIMCHI, A. (1985) - Close link between reduction of c-myc expression by interferon and G0/G1 arrest. Nature, 313: 597-600.

EK, B.; WESTERMARK, B.; WASTESON, A. & HELDIN, C.H. (1982) - Stimulation of tyrosine specific phosphorylation by PDGF. Nature 295: 419-420.

ESCH, F.; VENO, N.; BAIRD, A.; HILL, F.; DENOROY, L.; LING, N.; GOSPODAROWICZ, D. & GUILLEMIN, R. (1985) - Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factore (FGF). Biochem. Biophys. Res. Commun, 133: 554-562.

FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. (1983) - A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity 132: 6-13.

FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. (1984) - A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity- Addendum. Anal.Biochem. 137: 266-7.

FERAMISCO, J.R.; GROSS, M.; KAMATA, T.; ROSENBERG, M. & SWEET, R.W. (1984) - Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. Cell 38: 109-117.

FOLKMAN, J. & MOSCONA, A. (1978) - Role of cell shape in growth control. Nature, 273: 345-349.

GAMBARINI, A.G.; FUNCK, S.T.S. & ARMELIN, H.A. (1979) - Glioma cell growth: Effect of pituitary factor hydrocortisone and serum. Rev.Brasil.Biol. 39: 671-676.

GAMBARINI, A.G. & ARMELIN, H.A. (1982) - Purification and partial characterization of an acidic FGF from bovine pituitary. J.Biol. Chem. 257: 9692-9697.

GIBBS, J.B.; SIGAL, J.S.; POE, M. & SCOLNICK, E.M. (1984) - Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenes ras P21 molecules. Proc. Nat. Acad.Sci USA, 81: 5704-5708.

GIMENEZ-GALLEGO, G.; RODKEY, J.; BENNETT, C.; RIOS CANDELORE, .; DISALVO, J. & THOMAS, K. (1985) - Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete aminoacid sequence and homologies. Science, 230: 1385-1388.

GLENN, K.; BOWEN-POPE, D.F. & ROSS, R. (1982) - PDGF.II. Identification of PDGF-receptor by affinity labelling. J.Biol. Chem. 257: 5172-5176.

GODEAU, F.; PERSSON, H.; GRAY, H.E. & PARDEE, A.B. (1986) - c-myc expression is dissociated from DNA synthesis and cell division in Xenopus oocyte and early embryonic development. The EMBO J. 5: 3571-3577.

GOLDFARB, M.; SIMIZU, K.; PERUCHO, M. & WIGLER, M. (1982) - Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cell. Nature, 296: 404-409.

GONDA, T.J. & METCALF, D. (1984) - Expression of myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia. Nature, 310, 249-251.

GORMAN, C. (1985) - High efficiency gene transfer into mammalian cells. in: DNA cloning. Ed. D.M. Glover. IRL Press, p. 143-190.

GOSPODAROWICZ, D. & MESCHER, A. (1981) - Fibroblast growth factor and vertebrate regeneration. In: advances in neurology: neurofibromatosis, vol 29, eds. V.M. Riccardi and J.J. Mulvihill (Raven Press, New York) 149-171.

GOSPODAROWICZ, D.; RUDLAND, D.P.; LINDSTROM, J. & BENIRSCHKE, K. (1975) - Fibroblast growth factor: Localization, purification, mode of action, and physiological significance. In: advances in metabolic disordees, vol 8, ed. H.Luft (Stockholm) 301-335.

GOSPODAROWICZ, D.; VLODAVSKY, I. & SAVION, N. (1981) - The role of fibroblast growth factor and the extracellular matrix in the control of proliferation and differentiation of corneal endothelial cells. Vision Res, b21: 87-103.

GOSPODAROWICZ, D.; MASSAGLIA, S.; CHENG, I.; LUI, G.M. & BOHLEN, P. (1984) - Isolation by heparin sepharose affinity chromatography of brain fibroblast growth factor: identify with pituitary fibroblast growth factor. Proc. Natl.Acad. Sci USA **81**: 6963-69-67.

GOSPODAROWICZ, D.; MASSOGLIA, S.; CHENG, J.; LUI, G.M.; BOHLEN, P. (1985a) - Isolation of bovine pituitary, fibroblast growth factor purified by fast protein liquid chromatography (FPLC). Partial chemical and biological characterization. J. Cell Physiol. **122**, 323-393.

GOSPODAROWICZ, D., CHENG, J.; LUI, G.M.; FUIJU, D.K.; BAIRD, A. & BOHLEN, P. (1985b) - Fibroblast growth factor in the human placenta. Biochem.Biophys.Res. Commun. **30**: 554-559.

GRAHAM, F.L. & van der Eb, A.J. (1973) - A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus-5 DNA. Virology **52**: 456.

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

GREENBERG, M.E.; GREENE, L. & ZIFF, E.B. (1985) - Nerve growth factor and epidermal growth induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. J.Biol.Chem. **260**: 1401-141110.

GREENBERG, M.E.; HERMANOWSKI, A.L. & ZIFF, E.B. (1986) - Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos,c-myc and actin gene transcripition. Mol.Cell.Biol. **6**: 1050-1057.

GROTENDORST, G.R.; CHANG, T., SEPPÄ , H.E.J.; KLEINMAN, H.K. & MARTIN, G.R. (1982) - Platelet-derived growth factor is a chematoattractant for vascular smooth muscle cells. J. Cell Physiol. **113**: 261-6.

HABENICHT, A.J.R.; GLOMSET, J.A.; KING, W.C.; NIST, C.; MITCHELL, C.D. & ROSS, R. (1981) - Early changes in phosphatidylinositol and arachidonic acid metabolism in quiescent Swiss 3t3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. J.Biol. Chem. **256**: 12329-12335.

HARVEY, J.J. (1970) - An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. Nature, **204**: 1104-5.

HELDIN, C.H. & WESTERMARK, B. (1984) - Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. Cell **37**: 9-20.

HELDIN, C.H.; WESTERMARK, B. & WASTESON, A. (1979) - Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. Proc.Nat.Acad.Sci.USA **76**: 3722-3726.

HELDIN, C.H.; WESTERMARK, B. & WASTESON, A. (1980) - Chemical and biological properties of a growth factor from human cultured osteosarcoma cells: resemblance with platelet-derived growth factor. J.Cell. Physiol. **105**: 235-246.

HELDIN, C.H.; EK, B. & RONNSTRAND, L. (1983) - Characterization of the receptor for platelet-derived growth factor on human fibroblasts. Demonstration of an intimate relashionship with a 185,000 dalton substrate for the PDGF-stimulated kinase. J.Biol.Chem. **258**: 10054-10061.

HELDIN, C.; JOHNSSON, A.; WENNERGREN, S.; WERNSTEDT, C.; BETSHOLTZ, C. & WESTERMARK, B. (1986) - A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. Nature, **319**: 511-514.

HOLLEY, R.W. & KIERNAN, J.A. (1974) - Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low molecular weight nutrients. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, **71**: 2942-2945.

HOLT, J.T.; GOPAL, T.Y.; ROULTON, A.D. & NIENHUIS, A.W. (1986) - Inducible production of c-fos antigene RNA inhibits 3T3 cell proliferation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **83**: 4794-4798.

HUANG, J.S.; HUANG, S.S.; KENNEDY, B. & DEUEL, T.F. (1982) - Platelet-derived growth factor specific binding to target cells. J.Biol.Chem. **257**: 8130-8136.

HUNTER, T. & COOPER, J.A. (1985) - Protein tyrosine kinase. Ann.Rev.Biochem. **54**: 8997-930.

HURLEY, J.B.; SIMON. M.I.; TEPLOW, D.B.; ROBINSHAW, J.D. & GILMAN, A.G. (1984) - Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. Science **226**: 860-862.

JAYE, M.; HOWK, R.; BURGESS, W.; RICCA, G.A.; CHIU, I.; RAVERA, M.W.; O'BRIEN, S.; MODI, W.S.; MACIAG, T. & DROHAN, W.H. (1986) - Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence and chromosome localization.Science **233**: 541-545.

JENUWEIN, T.; RULLER, D.; CURRAN, T. & RULLER, R. (1985) - Extended life span and tumorigenicity of nonestablished mouse connective tissue cells transformed by the fos oncogene of FBR-rusy. Cell, **41**: 629-637.

JOHNSSON, A.; HELDIN, C.H.; WESTERMARK, B. & WASTESON, A. (1982)- Platelet-derived growth factor: identification of constituent polypeptide chains. Biochem.Biophys.Res.Comm. **104**: 66-74.

JOHNSSON, A.; HELDIN, C.H; WASTESON, A.; WESTERMARK, B.; DENEL, T.F.; HUANG, J.S.; SEEBURG, D.H.; GRAY, E.; ULLRICH, A.; SCRACE, G.; STROOBANT, P. & WATERFIELD, M.D. (1984) - The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. EMBO J. vol 3 921-928.

JONAK, G.J. & KNIGHT, E. Jr. (1984) - IFN causes on Daudi cells: c-myc mRNA decreased expression and differentiation. Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 81: 1747-1750.

KACZMAREK, L.; HYLAND, J.K.; WATT, R., ROSENBERG, M. & BASERGA, R. (1985) - Microinjected c-myc as a competence factor. Science 228: 1313-1315.

KAIBUCHI, K.; TSUDA, T.; KIKUCHI, A.; TANIMOTO, T.; YAMASHITA, T. & TAKAI, Y. (1986) - Possible involvement of protein kinase C and calcium ion in growth factor induced expression of c-myc oncogene in Swiss 3T3. J.Biol.Chem. 261: 1187-92.

KELLY, K.; COCKRAN, B.H.; STILES, C.D. & LEDER, P. (1983) - Specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell, 35: 603-610.

KINGSTON, R.E.; BALDWIN, A.S. & SHARP, P.A. (1985) - Transcription control by oncogenes. Cell, 41: 3-5.

KRONTIRIS, T.G. & COOPER, G.M. (1981) - Transforming activity of human tumor DNAs. PNAS USA 78: 1181-1184.

KRUIJER, W.; COOPER, J.A.; HUNTER, T. & VERMA, I.M. (1984) - Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. Nature, 312: 711-716.

KRUIJER, W.; SCHUBERT, D. & VERMA, I.M. (1985) - Induction of the protooncogene fos by nerve growth factor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82: 7330-7334.

LAAT, S.W.; BOONSTRA, J.; NOOLENDAR, W.H. & MUMMERY, C.L. (1985) Growth factor action and ionic signal transduction: characterization and relation to receptor expression; in Growth & Naturation Factors Ed. G. Guroff, John Wiley & Sons, vol 3.

LAI, M.M.C.; DUESBERG, P.H.; HORST, J. & VOGT, P.K. (1973) - Avian tumor virus RNA: A comparison of the three sarcoma viruses and their transformation-defective derivatives by oligonucleotide finger printing and DNA-RNA hybridization. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. PNAS, 70: 2266-2270.

LAND, H.; PARADA, L.F. & WEINBERG, R.A. (1983) - Tumorigenic conversion of primary fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature, 304: 596-602.

LAND, H.; CHEN, A.C.; MORGENSTERN, J.P.; PARADA, L.F. & WEINBERG, R.A. (1986) - Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. Mol.Cell. Biol. 6: 1917-1925.

LARSSON, E.L. & COUTINHO, A. (1979) - The role of mitogenic lectins in T cell triggering. Nature, 280: 239-241.

LEAL, F.; WILLIAMS, L.T., ROBBINS, K.C. & AARONSON, S.A. (1985) - Evidence that the v-sis gene product transforms by interactions with the receptor for platelet-derived growth factor. Science, 230: 327-330.

LEY, T.J.; ANAGNOU, N.P.; PEPE, G.; NIENHUIS, A.W. (1982) - RNA processing errors in patients with beta-thalassemia. PNAS-USA, 79: 4775-9.

LIBOI, E.; PELOSI, E.; TSTA, U.; PESCHLE, C. & ROSSI, G.B. (1986) - Proliferative response and oncogene expression induced by epidermal growth factor in ELZ rat fibroblasts. Mol.Cell.Biol. 6: 2275-2278.

LIPTON, A.; KINGER, J.; PAUL, D. & HOLLEY, R.W. (1971) - Migration of mouse 3T3 fibroblasts in response to a serum factor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 68: 2799-2804.

MAKINO, R.; HAYASHI, K. & SUGIMURA, T. (1984) - c-myc transcript is induced in rat liver at a very early cycloheximide treatment. Nature, 310: 697-699.

MANDEL, M. & HIGA, A. (1970) - Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J.Mol.Biol. 53: 154.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. (1982) - Molecular cloning - a laboratory manual - Cold Spring Harbor Laboratory.

MARTIN, G.S. (1970) - Rous sarcoma virus: function required for the maintenance of the transformed state. Nature, 227: 1021-3.

MARTIN, G.S. & DUESBERG, P.H. (1972) - The a subunit in the RNA of transforming Avian tumor viruses: I. occurrence in different virus strains. II. spontàneous loss resulting in non-transforming variants. Virology, 47: 494-7.

MILNER, S.M. (1977) - Activation of mouse spleen cell by a single short pulse of mitogen. Nature, 268, 441-442.

MITCHELL, R.L.; ZOKAS, L.; SCHREIBER, R.D. & VERMA, I.M. (1985) - Rapid induction of the expression of proto-oncogene fos during human monocytic differentiation. Cell, 40: 209-217.

MITCHELL, R.L.; HENNING-CHUBB, C.; HUBERMAM, E. & VERMA, I.M. (1986) - c- fos expression is neither sufficient nor obrigatory for differentiation of monocytes to macrophages. Cell, 45: 497-504.

MULCAHY, L.S.; SMITH, M.R. & STACEY, D.W. (1985) - Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. Nature, 313: 241-243.

MÜLLER, R. (1986) - Cellular and viral fos genes: structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. Biochem. biophys. Acta, 823: 207-225.

MÜLLER, R. & WAGNER, E.F. (1984) - Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos protooncogenes. Nature, 311: 438-442.

MÜLLER, R.; BRAVO, R.; BURCKHARDT, J. & CURRAN, T. (1984) - Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. Nature, 312: 716-720.

MÜLLER, R.; CURRAN, T.; MULLER, D. & GUILBERT, L. (1985) - Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. Nature, 314, 546-548.

NEUFELD. G. & GOSPODAROWICZ, D. (1985) - The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells.J.Biol.Chem. 260:13860-13867.

NEUFELD, G. & GOSPODAROWICZ, D. (1986) - Basic and acidic fibroblast growth factor interact with the same cell surface receptor. J.Biol.Chem. vol. 261: 5631-5637.

NIMAN, H.L.; HOUGHTEN, R.A. & BOWEN POPE, D.F. (1984) - Detection of high molecular weight forms of platelet-derived growth factor by sequence specific antisera. Science, 226: 701-3.

NISHIMURA, J.; HUANG, J.S. & DEUEL, T.F. (1982) - Platelet-derived growth factor stimulates tyrosine-specific protein kinase activity in Swiss mouse 3T3 cell membranes. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 79: 4303.

NISTER, M.; HELDIN, C.H.; WARTESON, A. & WESTERMARK, B. (1984) - A glioma-derived analog to PDGF: demonstration of receptor competing activity and immunological cross activity. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 81, 926-930.

O'NEIL, C.H.; RIDDLE, P.N. & JORDAN, P.W. (1979) - The relation between surface area and anchorage dependence of growth in hamster and mouse fibroblasts. Cell 16, 909-918.

O'NEIL, C.; JORDAN, P. & IRELAND, G. (1986) - Evidence for two distinct mechanisms of anchorage stimulation in freshly explanted 3T3 swiss mouse fibroblast. Cell, 44: 489-496.

PARADA, L.; TOBIN, C.; SHIH, C. & WEINBERG, R. (1982) - Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature, 297: 474-8.

PARADA, L.F.; LAND, H.; WEINBERG, R.A.; WOLF, D. & ROTTER, V. (1984) - Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation. Nature, 312, 649-651.

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

PARKS, W.P.; SCOLNICK, E.M. & KOZIKOWKI, E.H. (1974) - Dexamethasone stimulation of murine mammary tumor virus expression a tissue culture source of virus. Science, 184: 158-160.

PLEDGER, W.J.; STILES, C.D.; ANTONIADES, H.N. & SCHER, C.D. (1977) - Induction of DNA synthesis in Balb/c-3T3 cells by serum components: reevalution of the commitment process. Proc.Nat.Acad. Sci.USA, 74: 4481-4485.

PLEDGER, W.J.; HART, C.A.; LOCATELL, K.L. & SCHER, C.D. (1981) - Platelet-derived growth factor modulated proteins: constitutive synthesis by a transformed cell line. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 78: 4358-4362.

PROCHWANIK, E.V. & KUKOVSKA, J. (1986) - Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukemia cells prevents differentiation Nature, 322: 848-850.

PULCIANI, S.; SANTOS, E.; LAUVER, A.; LONG, L.K.; ROBBINS, K.C. & BARBACID, M. (1982) - Oncogenes in human cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. PNAS USA, 79, 2845-2849.

REDDY, E.; REYNALDS, R.; SANTOS, E. & BARBACID, M. (1982) - A point of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature, 300: 149.

REITSMA, P.H.; ROTHBERG, P.G.; ASTRIN, S.M.; TRIAL, J.; BAR-SHAVIT, Z.; HALL, A.; TEITELBAUM, S.L. & KAHN, A.J. (1983) - Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite. Nature, 306, 492-494.

ROBERTS, A.B.; ANZANO, M.A.; WAKEFIELD, L.M.; ROCHE, N.S.; STERN, D.F. & SPORN, M.B. (1985) - Type transforming growth factor a bifunctional regulator of cellular growth. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 82: 119-123.

ROSS, R.; RAINERS, E.W. & BOWEN POPE, D.F. (1986) - The biology of platelet-derived growth factor". Cell, 46: 155-169.

ROUS, P. (1911) - A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J.Exp.Med. 13: 397-411.

RULEY, H.E. (1983) - Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. Nature, 304: 602-606.

SALOMON, D.S.; LIOTTA, L.A. & KIDWELL, W.R. (1981) - Diferential response to growth factor by rat mammary epithelium plated on different collagen substrata in serum-free medium. Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 78: 382-386.

SCHER, C.D. & SIEGLER, R. (1975) - Direct transformation of 3T3 cells by Abelson murine leukemia virus. Nature, 253: 729-731.

SCHER, C.D.; PLEDGER, W.J.; MARTIN, P.; ANTONIADES, H.N. & STILES, C.D. (1978) - Transforming viruses directly reduce the cellular growth requirement for platelet-derived growth factor. J.Cell.Physiol. 97: 371-380.

SEPPÄ , H.; GROTENDORST, G.; SEPPÄ , S.; SCHIFFMANN, E. & MARTIN, G.R. (1982) - Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. J.Cell Biol. 92: 584-8.

SHERR, C.J.; RETTENMIER, C.W.; SACCA, R. & ROUSSEL, M.F.; LOOK, A.T. & STANLEY, E.R. (1985) - The c-fos proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. Cell, 41, 665.

SHIH, C. & WEINBERG, R.A. (1982) - Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. Cell, 29: 161-169.

SHOPE, R.E. (1983) - Infectious papillomatosis of rabits. J.Exp.Med. 58: 607-624.

SINGH, J.P.; CHAIKIN, M.A.; PLEDGER, J.; SCHER, C.D. & STILES, C.D. (1983) - Persistence of the mitogenic response to platelet-derived growth factor (competence) does not reflect a long-term interaction between the growth factor and the target cell. J.Cell Biol. 96: 1497-1502.

SMITH, J.D. & STILES, C.D. (1981) - Cytoplasmic transfer of the mitogenic response to platelet-derived growth factor. 78: 4363-4367. Proc. Nat. Acad. Sci. USA.

SMOTKIN, D.; GIANNI, A.M.; ROZEN BLATT, S. & WEINBERG, R.A. (1975) - Infectious viral DNA fo murine leukemia virus . Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 72: 4910-4915.

SPANDIDOS, D.A. & WILKIE, N.M. (1984) - Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. Nature, 310: 469-475.

SPORN, M.B. & TODARO, G.J. (1980) - Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N.Eng.J.Med. 303: 878-880.

SORRENTINO, V.; DROZDOFF, V.; McKINNEY, M.D.; ZEITZ, L. & FLEISSNER, E. (1986) - Potentiation of growth factor activity by exovenous c-myc expression. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 83: 8167-8171.

SOUTHERN, E.M. (1975) - Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol. Biol, 98: 503-517.

SOUTHERN, P.J. & BERG, P. (1982) - Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J. Mol.App. Genetics 1, 327-341.

STACEY, D.W. & KUNG, H.F. (1984) - Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein. Nature, 310: 508-511.

STALLAUP, M.R.; RING, J.C.; UCKER, D.S. & YAMAMOTO, K.R. (1979)- Mammary tumor virus genes: probes for mechanisms of transcriptional regulation. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, 6: 919-936.

STERN, D.F.; ROBERTS, A.B.; ROCHE, N.S.; SPORN, M.B. & WEINBERG, R.A. (1986) - Differential responsiveness of myc- and ras-transfected cells by epidermal growth factor. Mol.cell.Biol. 6: 870-877.

STEWART, T.; PATTENGALE, P.K. & LEDER, P. (1984) - Spontaneous mammary adenocarcinoma in transgenic mice that carry and express MMTV/myc fusion genes. Cell, 38: 627-637.

STILES, C.D. (1983) - The molecular biology of platelet-derived growth factor. Cell, 33: 653.

STILES, C.D.; CAPONE, G.T.; ANTONIADES, H.N.; VAN WYK, J.J. & PLEDGER, W.J. (1979) - Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. Proc.Nat.Acad. Sci.USA, 76: 1279-1283.

STROOBANT, P. & WATERFIELD, M.D. (1984) - Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. EMBO J. 3: 2963-2967.

STROOBANT, P.; GULLICK, W.J.; WATERFIELD, M.D. & ROZENGURT, E. (1985) - Highly purified fibroblast-derived growth factor, an SV40-transformed fibroblast-secreted mitogen, is closely related to platelet-derived growth factor. EMBO J. 4: 1945-9.

SWEET, R.W.; YOKOYAMA, S.; KAMATA, T.; FERAMISCO, J.; ROSENBERG, M. & GROSS, M. (1984) - The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. Nature, 311: 273-275.

SZYBALSKA, E.H. & SZYBALSKI, W. (1962) - Genetics of human cell lines, IV. DNA - mediated heritable transformation of a biochemical Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 48: 2026-2034.

TABIN, C.; BRADLEY, S.; BARGMANN, C.; WEINBERG, R.; PAPAGEORGE, A.; SCOLNICK, E.; DHAR, R., LOWY, D.; & CHANG, E. - Mechanism fo activation of a human oncogene. Nature, 300: 143-145.

TAMANOI, F.; WALSH, M.; KATAOKA, T. & WIGLER, M. (1984) - A product of yeast ras 2 gene is a guanine nucleotide binding protein. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 81: 6924-6929.

TAYLOR, M.Y.; GUSSE, M.; EVAN, G.I.; DATHAN, N. & MECHALI, M. (1986) - Xenopus myc proto-oncogene during development: expression as a stable maternal mRNA uncupled from cell division. EMBO J. 5: 3563-3570.

TEMIN, H.M. & RUBIN, H. (1958) - Characteristics of an assay for Rous Sarcoma Virus and Rous Sarcoma Cells in tissue culture. Virology, 6: 669-688.

THIEL, H. J.; & HAFENRICHTER, R. (1984) - Simian sarcoma virus transformation-specific glycopeptide: immunological relationship to human platelet-derived growth factor. Virology, 136: 414.

THOMAS, P.S. (19800 - Hibridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 77: 5201-5205.

THOMAS, K.A.; RIOS-CADELORE, G.; GIMENEZ-GALLEGO, I.; DI SALVO, C.; BENNET, J.; RODKEY, J. & FITZPATRICK, S. (1985) - Pure brain derived fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin-1. Proc.Nac.Acad.Sci.USA, 82: 6409-6413.

THOMAS, K.A. & GALLEGO-GIMENEZ (1986) - Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. TIBS 11: 81-84.

TODARO, G.J. & DE LARCO, J.E. (1978) - Growth factors produced by sarcoma virus transformed cells. Cancer Res. 38: 4147-4154.

TODARO, G.J.; LAZAR, G.K. & GREEN, H. (1965) - The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. J. Cell.Com.Physiol. 66: 535-334.

TOGARI, A.; DICKENS, G.; HUZUYA, H.; & GUROFF, G. (1985) - The effect of fibroblast growth factor on PC-12 cells. J. Neurosci. 5: 307-316.

TOOZE, J. & SAMBROOK, J. (1974) - Selected papers in tumor vorology. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1974.

van BEVEREN, C.; van STRAATEN, F.; CURRAN, T.; MULLER, R. & VERMA, I. (1983) - Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxi-termini. Cell 32: 1241-1255.

van BEVEREN, C.; ENAMI, S.; CURRAN, T. & VERMA, I. (1984) - FBR murine osteosarcoma virus. II. Nucleotide sequence of the provirus reveals that the genome contains sequences acquired from two cellular genes. Virology. 135, 229-243.

van ZOELEN, E.J.J.; van de YEN, W.J.M.; FRANSSEN, H.J.; van OOSTWAARD, T.M.J.; van der SAAG, P.T.; HELDIN, C.H. & DE LAAT, S.W. (1985) - Neuroblastoma cells express c-sis and produce a transforming growth factor antigenically related to the platelet-derived growth factor. Mol.Cell.Biol. 5: 2289-2297.

VENNSTROM, B.; KAHN, P.; ADKINS, B. ENRIETTO, P.; HAYMAN, M.J.; GRAF, T. & LUCIW, P. (1985) - Transformation of mammalian fibroblast and macrophages in vitro by a murine retrovirus encoding an avian v-myc oncogene. EMBO J. 3: 3223-3229.

VERMA, I.M. (1986) - Proto-oncogene fos: a multifaceted gene. Frends in Genetics Reviews (April 1986) p. 93-96.

VOGT, M.; LESLEY, J.; BOGENBERGER, J.; VOLKMAN, S. & HAAS, M. (1986) - Coinfection with viruses carrying the v-Ha-ras and v-myc oncogenes leads to growth factor independence by an indirect mechanism. Mol.Cell.Biol. 6: 3545-3549.

WAGNER, J.A. & D'AMORE, P.A. (1986) -Neurite outgrowth induced by an endothelial cell mitogen isolated from retina. J. Cell.Biol. 103: 1363-1367.

WATERFIELD, M.D.; SCRACE, G.T.; WHITTLE, N.; STROOBANT, P.; JOHNSON, A.; WASTESON, A.; WESTERMARK, B.; HELDIN, C.H.; HUANG, J.S. & DEVEL, T.F. (1983) - Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. Nature, 304, 35-39.

WEISS, R.; TEICH, N.; VARMUS, H. & COFFIN, J. (1982) - RNA tumor viruses - Molecular Biology of tumor viruses - 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. New York.

WHITE, B.A. & BANCROFT, F.C. (1982) - CYtoplasmic dot hybridization-simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell on tissue samples. J.Biol.Chem. **257**: 8569-72.

WIGLER, M.; SILVERSTEIN, S.; LEE, L.S.; POLLICER, A.; CHENG, Y. & AXEL, R. (1977) - Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell, **11**: 223-232.

WIGLER, M.; SWEET, R.; SIM, G.K. WOLD, B.; PELLICER, A.; LACY, E.; MANIATIS, T.; SIVERSTEIN, S. & AXEL R. (1979) - Transformation of mammalian cells with genes from procariotes and eucariotes. Cell, **16**: 777-785.

YEN, A. & PARDEE, A.B. (1978) - Exponential 3T3 cells escape in mid-G1 from their high serum requeriment. Exp.Cell.Res. **116**: 103-113.

ZULLO, J.N.; COCHRAN, B.H.; HUANG, A.S. & STILES, C.D. (1985) - Platelet-derived growth factor and double-stranded ribonucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. Cell, **43**: 793-800.