

Ana Lucia Beirão Cabral

**Regulação da expressão do promotor do gene do
receptor de glicocorticóide em clones de células
transfectadas com o proto-oncogene *c-jun*.**

Tese apresentada ao
departamento de farmacologia
da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de farmacologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

Campinas - 1996

6978164

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T. UNICAMP	
CURR	
V.	Ev.
T. P. D. BC	28893
PROD.	663/96
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/10/96
N.º CPD	

CM-00093702-7

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C112r Cabral, Ana Lucia Beirão
Regulação da expressão do promotor do gene do receptor de glicocorticóide em clones de células transfectadas com o proto-oncogene *c-jun* / Ana Lucia Beirão Cabral. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Vilma Regina Martins
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

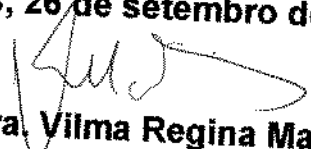
I. Glicocorticóides. 2. Proteínas. I. Vilma Regina Martins. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Ana Lucia Beirão Cabral

Regulação da expressão do promotor do gene do
receptor de glicocorticóide em clones de células
transfectadas com o proto-oncogene *c-jun*.

**Este exemplar corresponde à versão final da
tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, na Área de
Farmacologia da Bióloga Ana Lúcia Beirão
Cabral**

Campinas, 26 de setembro de 1996


**Profa. Dra. Vilma Regina Martins
- Orientadora -**

Campinas, 1996

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Vilma Regina Martins

Membros:

1. Profa. Dra. Vilma Regina Martins
2. Profa. Dra. Lúcia Leina Velloso
3. Profa. Dra. Mary Rosa de Souza Queiroz

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/09/96

A meus pais Nilton e Julia,
a meu marido Luciano
e a todos que têm me apoiado
com carinho na realização
deste sonho

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vilma Regina Martins pela participação decisiva em minha formação científica e brilhante orientação deste trabalho.

À Dra. Maria Mitzi Brentani pelo apoio e confiança inicial em mim depositados.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani pela acolhida nas dependências do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer- SP, o que possibilitou a realização de parte dos experimentos aqui apresentados.

À Dra. Luisa L. Villa pela síntese do oligonucleotídeo correspondente à região similar a AP-1 do promotor de GR, além dos comentários valiosos quando da apresentação deste trabalho.

À Dra. Mírian H. Honda Federico pela amizade e valiosas sugestões feitas a este trabalho.

Aos Drs. Mary Luci Souza Queiroz e Gilberto de Nucci pela receptividade em participar da banca examinadora.

A todos os companheiros do Laboratório de Oncologia da FMUSP e do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - SP pela amizade sincera.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia que contribuíram para a realização de meu curso de mestrado.

À Maria Cristina P. Grandal e Lionel C. B. de Sousa pelo excelente trabalho fotográfico realizado.

À Izabel Costa Carneiro da Silva, Chamberlein Eduardo Mendonça Neto, Manoel E. dos Santos, Maria Linda da Silva e José Ferreira pelo trabalho técnico no preparo dos materiais utilizados no laboratório.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Introdução.....	4
Materiais e Métodos:	
1- Amplificação dos vetores de expressão.....	18
2- Cultivo de células.....	21
3- Transfecção celular estável.....	21
4- Transfecção celular transitória.....	22
5- Dosagem da atividade de β -galactosidase.....	23
6- Dosagem da atividade de CAT.....	24
7- Isolamento do RNA celular.....	25
8- “Northern blotting”.....	26
9- Quantificação do receptor de glicocorticóide: ligação ao hormônio radioativo.....	27
10- Quantificação da proteína c-Jun: “Western blot”.....	29
11- Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética.....	31
Resultados.....	35
Discussão.....	73
Conclusões.....	83
Referências Bibliográficas.....	84

ABREVIATURAS

ACTH- hormônio adrenocorticotrópico
AMP- adenosina mono fosfato
AP-1-activating protein 1
Ap-1c - sequência AP-1 consenso
AP-1GRprom- sequência similar a AP-1 do promotor de GR
AP-1m- AP-1 mutante
ATF2- “AMPcyclic responsive element binding protein 1”
CAT- cloranfenicol acetil transferase
CRE- “AMP cyclic responsive element”
DMEM- meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA - ácido desoxiribonucleico
DO- densidade óptica
E. coli- Escherichia coli
FBS- soro fetal bovino
fmoles- fento moles
G418- neomicina
GAPDH- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDP- guanosina di fosfato
GR- receptor de glicocorticóide
GRE- “glucocorticoid responsive element”- região do DNA de ligação do GR
GTP- guanosina tri fosfato
H-ras- “Harvey rat sarcoma virus”
JNK- “Jun N-terminal kinase”
Kb- kilobases
kDa- kilo Daltons
MEKK ou MAPKKK- “mitogen activating protein kinase kinase kinase”
MMTV- “mamary mouse tumor virus”
NIH3T3 *c-jun*- clones de células transfectadas com pRSV *c-jun*
Rel- valor relativo
RNA- ácido ribonucleico
RPM- rotações por minuto
RSV- “Rous sarcoma virus”
SAPK- “stress activating protein kinase”
SDS- dodecil sulfato de sódio
T1 e T2- domínios de transativação de GR
TNF- “tumor necrosis factor”
TPA- éster de forbol (12-o-tetradecanoilforbol β -acetato)
UV- radiação ultra-violeta
v-mos- “Moloney murine sarcoma virus”
v-src- “Rous sarcoma virus” (oncogene)

RESUMO

Os hormônios glicocorticóides, com conhecida ação antiinflamatória e antitumoral, agem apenas em células com receptores citoplasmáticos específicos (GR), portanto se torna extremamente importante conhecer os mecanismos envolvidos na regulação da expressão destes receptores para avaliar a resposta ao hormônio.

Trabalhos preliminares realizados pelo nosso grupo em células transformadas pelo oncogene EJ-ras apontam para uma regulação negativa de GR a nível transcricional de GR decorrente desta transformação. Entretanto, a oncoproteína não pode regular diretamente a transcrição gênica já que está ancorada à membrana celular.

O promotor do gene de GR possui um elemento similar a AP-1 e isto, aliado ao fato de que Ras participa diretamente do processo de fosforilação de c-Jun, sugere que o produto deste proto-oncogene pode ser um dos alvos nucleares de Ras para a regulação do promotor do gene de GR.

O presente trabalho teve como objetivo determinar o papel de c-Jun na regulação do promotor do gene de GR e analisar a capacidade de ligação da proteína c-Jun ao elemento AP-1 presente neste promotor.

Para tanto foram gerados clones de células NIH3T3 transfectadas com *c-jun* e estes foram analisados quanto à expressão do RNA mensageiro (RNAm) de *c-jun* e GR, bem como as respectivas proteínas por eles codificadas.

A análise dos dados da expressão de c-Jun e GR, a nível de RNAs mensageiros e de proteínas, mostram que nos clones onde há aumento do RNAm de *c-jun* há decréscimo do RNAm de GR, sugerindo que a presença de c-Jun possa atenuar a transcrição do gene de GR. Entretanto nem sempre se encontrou uma correlação inversamente proporcional entre o RNAm de *c-jun* e de GR. Os valores obtidos após a determinação da concentração das proteínas c-Jun e GR evidenciam um padrão de regulação gênica muito mais complexo. Novamente ficou constatado que não havia correspondência entre os valores dos RNAs mensageiros e proteínas c-Jun e GR.

Foram realizados ainda ensaios de retardamento de mobilidade eletroforética, utilizando a sequência AP-1 do promotor do gene de GR e extratos nucleares dos clones NIH3T3 *c-jun*. Estes experimentos comprovam uma regulação mais complexa, pois mostram que a proteína c-Jun contida nos extratos nucleares não é capaz de se ligar à sequência similar à AP-1 contida no promotor do gene de GR. Concluindo que a regulação do gene de GR por c-Jun não é dada diretamente por sua interação com o elemento específico contido no promotor deste gene.

ABSTRACT

Glucocorticoid receptors (GR) mediate the cellular response to glucocorticoid hormones which are known for their anti-inflammatory and anti-tumoral actions. The mechanisms involved on the regulation of GR gene expression are extremely important for the cellular response to the hormone and remain unknown.

Using transient transfections, we have previously reported that cells transformed with the oncogene *EJ-ras* had an attenuation on the GR gene transcription. However, this effect could not be mediated through a direct action of the oncoprotein on the gene transcription, once Ras is anchored at the cellular membrane.

An AP-1 like site was found in GR gene promoter and the fact that Ras protein activates fosforilation of c-Jun suggests that it might be a Ras' nuclear target and one of the transcription factors responsible for the regulation of GR gene expression.

The aim of this work was to settle the role of c-Jun on GR expression and evaluate the c-Jun ability to bind the AP-1 like site present on GR gene promoter.

In this study we generated NIH3T3 cells clones stabled transfected with *c-jun* and analyzed their c-Jun and GR mRNA and protein contents.

We observed that clones with higher *c-jun* mRNA levels have lower GR mRNA when compared with non transfected cells suggesting that c-Jun can attenuate the GR gene transcription. We did not find a direct correlation between mRNA and protein levels of both *c-jun* and GR. These data indicate that a more complex mechanism may be involved.

Eletrophoretic mobility shift assays were performed to test the binding of c-Jun to the AP-1 like site present on the GR gene promoter. The results showed that this association is much lower than the one observed by the consensus AP-1, suggesting that the GR gene expression regulation by c-Jun does not seem to be due to its interaction with the AP-1 like site present on the GR gene promoter.

INTRODUÇÃO

Os corticosteróides têm ampla diversidade de ação e têm sido bastante estudados nos dois últimos séculos.

Em 1855 Addison já havia descrito a importância das glândulas adrenais. Mais tarde outros pesquisadores demonstrariam os efeitos da adrenalectomia em animais de laboratório.

O córtex da adrenal, em sua zona fasciculada, sintetiza duas classes de esteróides a partir do colesterol: os andrógenos e os corticosteróides. Esta última agrupa os glicocorticóides (cortisol) e os mineralocorticóides (aldosterona) (Ilustração 1A).

Historicamente, o cortisol foi o primeiro corticosteróide a ser isolado e estudado. Entre as décadas de 30 e 40 deste século, foram isoladas a cortisona e a hidrocortisona (Ilustração 1B) também chamada de cortisol. Somente na década de 50 a aldosterona foi isolada (revisado por Korolkovas e Busckhatter, 1982).

No homem o cortisol, secretado sob condições normais em taxas de 10-15 mg/dia, é o principal glicocorticóide, sendo responsável por cerca de 95% de toda atividade exercida por estes hormônios (Esteban e cols, 1991).

Os hormônios glicocorticóides participam do equilíbrio metabólico de glicídios, lipídeos e proteínas, sendo estimulados por estresse psicológico, físico ou químico (Liddle, 1981).

A secreção do cortisol é controlada pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), liberado pelo lobo anterior da hipófise. Este hormônio ativa a adenil ciclase na membrana das células córtico-supra-renais. A adenil ciclase induz o AMP cíclico, que atua como

segundo mensageiro e este, por sua vez, induz as enzimas intracelulares envolvidas na formação dos hormônios córtico-supra-renais. A principal enzima em questão é a desmolase que induz a conversão inicial do colesterol em pregnenolona. Qualquer tipo de estresse pode, via hipotálamo, determinar a liberação de ACTH pela adenohipófise que desencadeará a liberação de glicocorticóide para a corrente sanguínea (revisado por Guyton, 1989).

Os mamíferos alternam períodos de ingestão e abstinência alimentar, o que não impede um contínuo gasto de substratos energéticos e plásticos necessários à subsistência e às funções dos múltiplos tecidos e órgãos. Durante o período alimentar existe armazenamento de substratos na forma de glicogênio, ácidos graxos e aminoácidos. Os glicocorticóides conhecidos por "hormônios do jejum" garantem e regulam, junto com o glucagon, as catecolaminas e o hormônio do crescimento, a transformação dos substratos armazenados em energia, num processo denominado gliconeogênese (revisado por Guyton, 1989). Este processo garante a sobrevivência de órgãos e tecidos extremamente dependentes de glicose como o coração e o cérebro, pois há estimulação do fígado, no jejum, para formação de glicose a partir de aminoácidos e glicerol. Nos tecidos periféricos, os glicocorticóides diminuem a utilização da glicose e ativam a lipólise, provendo de aminoácidos e glicerol a gliconeogênese (revisado por Aires, 1986).

A participação dos glicocorticóides nos mecanismos de diminuição da utilização da glicose periférica ou indução da gliconeogênese no fígado ainda não está totalmente esclarecida. Sabe-se que uma de suas funções é induzir a transcrição de um grande número

de enzimas do fígado envolvidas no processo da gliconeogênese (Pilkis e Granner, 1992).

A aplicação terapêutica dos glicocorticóides é ampla. O uso clínico normalmente requer doses maiores do que a produção fisiológica destes hormônios, portanto os possíveis efeitos colaterais devem ser monitorados com cuidado (Nilton D. Cabral, comunicação pessoal).

Existem muitos mecanismos que estão envolvidos na supressão da inflamação pelos glicocorticóides. Sabe-se que o hormônio é responsável pela diminuição da liberação de fatores vasoativos e quimiotáticos, diminuição da secreção de enzimas lipolíticas e proteolíticas, decréscimo do extravasamento de leucócitos na área afetada e, por fim, diminuição de fibrose. Além disso estes hormônios também exercem importantes efeitos em respostas imunes específicas, principalmente na redução da produção de citocinas, suprimindo a resposta imune (revisado por Schimmer e Parker, 1996).

Reichlin (1993) propôs que estes efeitos do hormônio protegem o organismo das conseqüências da reação inflamatória. Portanto, os glicocorticóides teriam efeito benéfico em doenças inflamatórias como por exemplo: lupus, glomerulonefrite e artrite reumatóide. No caso desta última, além da supressão da inflamação pelos mecanismos anteriormente descritos, o hormônio inibe a expressão de collagenase e estromelisina, envolvidas na degeneração tecidual que caracteriza esta doença (Brinckerhoff e cols, 1986; Frisch e Ruley, 1987). Após sua administração, nestes casos, a inflamação desaparece dentro de 24 a 48 horas (revisado por Guyton, 1989).

A administração sistêmica do hormônio também tem sido empregada para tratamento de asma severa crônica (Greenberger, 1992;

Mc Fadden, 1993). Esta doença promove um quadro inflamatório e o hormônio pode reverter o processo (Goldstein e cols, 1994). Postula-se que a administração de aerossóis na asma moderada (Busse, 1993; Lipworth, 1993; Pavord e Knox, 1993) pode ser mais eficaz do que a administração oral (Barnes, 1995).

Em casos de adrenalectomia ou doença de Addison o hormônio é usado como terapia de reposição, requerendo geralmente doses regulares diárias de prednisona (Ilustração 1B), um análogo sintético da hidrocortisona que apresenta uma dupla ligação entre os carbonos 1 e 2 (revisado por Schimmer e Parker, 1996).

Os glicocorticóides também são indicados para o tratamento de doenças inflamatórias da pele como eczema e psoríase (Sulzberger e Witten, 1952). Estas são tratadas com aplicações tópicas de triancinolona (Ilustração 1B) ou mesmo com administração do glicocorticóide intravascular ou intramuscular (Guzzo e Werth, 1996). A triancinolona possui um grupamento 6α -F no anel aromático e assim como na prednisona, estas substituições conferem um aumento expressivo das atividades hormonais, entre elas a ação antiinflamatória. A presença deste grupamento promove uma melhor conformação espacial e eletrônica admitida pelos anéis, o que proporciona uma ligação mais forte com o receptor (Korolkovas e Busckhatter, 1982).

Além de todas as ações conhecidas do glicocorticóide na terapêutica humana, este hormônio tem sido associado a um bloqueio irreversível no crescimento de células linfóides S49 (Harmon e cols, 1979). Ele pode também bloquear a formação de foco em certas culturas celulares mediada por agentes indutores de tumor como os ésteres de forbol (Scribner e Slaga, 1973) e reverter o fenótipo

transformado de células de glioma de rato (Armelin e cols, 1983; Valentini e Armelin, 1996).

É sabido ainda que, *in vitro*, o hormônio glicocorticóide participa do processo de diferenciação celular pois ativa, juntamente com insulina e prolactina, a diferenciação de células epiteliais mamárias (Danielson e cols, 1984; Doppler e cols, 1989; Reichmann e cols, 1989). *In vivo* este hormônio também participa de parte do programa de diferenciação da glândula mamária (Steinberg e cols, 1975) e ainda possui a função de manter a lactação pois, aliado à prolactina, impede a regressão glandular em roedores (Ossowski e cols, 1979).

Portanto, a interferência e modificação do crescimento e diferenciação celulares mediadas pelos glicocorticóides sugerem um possível papel antitumoral deste esteróide.

O transporte hormonal na corrente sangüínea é realizado via proteínas como a α globulina e a albumina, que impedem a passagem aleatória do hormônio do capilar aos tecidos e aumentam sua estabilidade (Guyton, 1989).

O hormônio fica retido, e é funcional, apenas em células com receptores intracelulares específicos (Baxter e Funder, 1979), que permanecem inativos quando associados a proteínas de choque térmico, como a hsp90 (Joab e cols, 1984; Sanchez e cols, 1985).

A ilustração 2 apresenta o mecanismo de ação do hormônio glicocorticóide (A) e em detalhe sua interação com as proteínas de choque térmico (B). Após a interação do hormônio com o receptor, as proteínas de choque térmico são dissociadas (Sanchez e cols, 1987) por mudança conformacional do último (Scherrer e cols, 1993), e o complexo hormônio-receptor passa a apresentar alta afinidade pelo

núcleo. Neste, um homodímero contendo duas moléculas receptoras associa-se a elementos específicos do DNA denominados elementos de resposta a glicocorticóide (GRE) (Tsai e cols, 1989), funcionando como fator de transcrição (Sakai e cols, 1988).

O GRE é uma sequência palindrômica parcial AGAACAnnnTGTTCT, onde cada metade da sequência é ligada por um monômero do receptor (Tsai e cols, 1988; Luisi e cols, 1991). Somente na forma de dímero é que GR é capaz de se ligar ao DNA com afinidade suficiente para regular a transcrição de um RNA mensageiro (Tsai e cols, 1989), gerando ao final do processo proteínas efetoras que caracterizam a ação hormonal (Spelsberg e cols, 1988). O receptor pode ainda reprimir a transcrição de certos genes por mecanismos mais complexos ainda não totalmente esclarecidos (Diamond e cols, 1990; Jonat e cols, 1990).

O receptor de glicocorticóide (GR) pertence à superfamília dos receptores esteroídicos que são potentes fatores transcricionais dependentes do ligante específico (Evans, 1988; Beato, 1989). A estrutura da molécula é caracterizada por três domínios funcionais (Giguere e cols, 1986): um de transativação amino-terminal, um de ligação ao DNA central e um de ligação ao hormônio carboxi-terminal (O'Malley, 1990; Spanjaard e Chin, 1993).

A região amino-terminal de GR possui um domínio de transativação T1 (Giguere e cols, 1986; Hollenberg e Evans, 1988), cuja função parece ser a de aumentar a potência estimulatória da transcrição. Deleções nesta região podem causar diminuição do potencial de trans-ativação de GR de 50 a 80% (O'Malley, 1990).

O domínio de ligação ao DNA possui 66 aminoácidos e é extremamente conservado entre a superfamília dos receptores esteroídicos (Green e cols, 1986; Loosfeld e cols, 1986). Faz parte deste domínio uma região rica em cisteínas (nove resíduos) que compõe duas estruturas com o formato de "dedos", cada uma coordenada por um átomo de zinco, denominadas "dedos de zinco" (Sabbah e cols, 1987; Freedman e cols, 1988). Dados da literatura reportam que a remoção de uma destas estruturas por deleção impede a ligação de GR ao DNA e conseqüente regulação da transcrição gênica (Hollenberg e Evans, 1988).

O domínio de ligação ao hormônio agrupa outras regiões com funções específicas, como por exemplo a região de interação com proteínas de choque térmico (Pratt e cols, 1988), a região T2 de transativação (Hollenberg e Evans, 1988) e duas regiões de translocação nuclear dependentes de ligação ao hormônio (Picard e Yamamoto, 1987).

Hoje se sabe que cisteínas na posição 638 e 665 do domínio de ligação ao hormônio são responsáveis pela ligação específica do glicocorticóide em seu receptor. Yu e cols (1995) provaram este dado ao avaliar a capacidade de ligação deste domínio à dexametasona (Ilustração 1B): a substituição destes resíduos específicos por serina leva os mutantes a ligar o hormônio com dez vezes menos afinidade do que a apresentada pelo tipo selvagem.

Uma vez que a resposta ao hormônio glicocorticóide *in vivo* ou *in vitro* é dependente da concentração (Vanderbilt e cols, 1987) e integridade dos receptores (Byravan e cols, 1991), torna-se crucial o

entendimento da regulação da expressão do gene codificador da proteína receptora.

Vários fatores podem modificar a expressão do gene de GR, inclusive o próprio receptor (Okret e cols, 1991). Há alguns anos vários grupos têm sugerido que células transformadas por oncogenes apresentam alterações na resposta a glicocorticóide.

Sabe-se que a diferenciação de pré-adipócitos, normalmente induzida por glicocorticóide, é inibida pelo oncogene *v-mos* (“Moloney murine sarcoma virus”) (Greenberger e cols, 1979) e que *v-mos* atenua ainda a indução da expressão do gene da metalotioneína mediada por glicocorticóide (Hamilton e DeFranco, 1989).

Jaggi e cols (1986) mostraram que a atividade transcricional do promotor de MMTV (“mamary mouse tumor virus”), dependente de glicocorticóide, estava diminuída em células transformadas pelos oncogenes *H-ras* (“Harvey rat sarcoma virus”) e *v-mos*. Posteriormente, este mesmo grupo demonstrou que a presença das proteínas codificadas pelos oncogenes *H-ras*, *v-mos* e *v-src* (“Rous sarcoma virus”) levava a um declínio no número de GR retidos no núcleo celular, o que evidenciava uma diferença de compartimentalização e sugeria a existência de algum mecanismo de seqüestro desta proteína no citoplasma que a tornava inativa (Jaggi e cols, 1989).

Martins e Brentani (1990) constataram a diminuição no número de receptores de glicocorticóide em células transformadas com o oncogene *H-ras*. Em um trabalho posterior mostrou-se que nestas células com alta expressão de Ras mutado, havia redução da transcrição do gene do receptor de glicocorticóide (Martins e cols, 1995).

Entretanto, os mecanismos que levam a regulação do gene de GR por Ras não são ainda totalmente conhecidos.

A proteína Ras está ancorada à membrana celular (Barbacid, 1987) e não poderia regular diretamente a transcrição gênica. A partir destes dados, nosso grupo deu início à investigação dos possíveis alvos nucleares de Ras que funcionariam como intermediários no processo de regulação da expressão gênica de GR.

A proteína Ras normal é ligada a GDP (guanosina di-fosfato) e quando ativada associa-se à GTP (guanosina tri-fosfato) e desencadeia uma cascata de fosforilações que são responsáveis pela transdução do sinal inicialmente deflagrado (Barbacid, 1987; Lowy e Willumsem, 1993). Este é interrompido quando GTP é hidrolizado da molécula de Ras, que volta a se associar à GDP. A oncoproteína Ras tem grande afinidade por GTP e é incapaz de hidrolisá-lo do seu sítio ativo, o que leva a uma transdução constante e alterada de sinal (Haubruck e McCormick, 1991).

Uma das proteínas quinases envolvidas na transdução de sinal desencadeada por Ras é MEKK também conhecida por MAPKKK (“mitogen activating protein kinase kinase kinase”), que é capaz de induzir a transcrição de fatores de transcrição como c-Jun, um membro da família AP-1, e ATF2 (“AMP cyclic responsive element binding protein 1”) (revisado por Marshall, 1995).

Além de poder ativar a transcrição dessas proteínas, Ras ativada também é capaz de induzir indiretamente via SAPKs (“Stress activating protein kinase”), a fosforilação e, portanto, a atividade transcricional de c-Jun (Smeal e cols, 1991; Lin e cols, 1995) e ATF2, resultando em um aumento da transcrição dos genes-alvo (Pronk e Bos, 1994).

Os fatores de transcrição da família AP-1 não são induzidos apenas por Ras. Outros agentes como ésteres de forbol, radiação UV, TNF α ("Tumor Necrosis Factor") e fatores de crescimento do soro (Angel e cols, 1987; Schöntal e cols, 1988; Stein e cols, 1988; Brenner e cols, 1989; Stein e cols, 1989) podem fazê-lo.

A família AP-1 agrupa as sub-famílias Jun: c-Jun (Bos e cols, 1988), JunB (Ryder e cols, 1988) e JunD (Hirai e cols, 1989, Ryder e cols, 1989), Fos: c-Fos (Franza e cols, 1987), Fra-1 (Cohen e Curran, 1988), Fra-2 (Matsui e cols, 1990; Nishina e cols, 1990) e FosB (Zerial e cols, 1989). Os membros de uma sub-família formam heterodímeros com os de outra sub-família. Entretanto, só os componentes da sub-família Jun são capazes de formar homodímeros (Ryseck e Bravo, 1991). As recém isoladas proteínas Maf como c-Maf (Kataoka e cols, 1993), MafB (Kataoka e cols, 1994), MafK, MafF e MafG (Kataoka e cols, 1995) podem se complexar a Jun e Fos e estender o potencial regulatório de AP-1 (Jurdic e cols, 1995).

Os membros da família AP-1 são proteínas com estrutura em α -hélice que interagem em uma região rica em leucinas, denominada primeiramente por Landschultz e cols (1988) de "zíper de leucina", formando heterodímeros (revisado por Ryseck e Bravo, 1991).

Glover e Harrison (1995) mostraram, a partir de experimentos de cristalografia, que c-Fos e c-Jun quando complexados ligam-se à fita dupla de vinte nucleotídeos do DNA que contém um elemento de regulação denominado AP-1 (5'- TGACTCA -3') pelas extremidades aminoterminais de ambos os monômeros. Fos e Jun realizam desta forma contato idêntico com o elemento AP-1 do DNA (Ellenberger e cols, 1992). Uma vez ocorrida a dimerização e a interação com o

elemento AP-1 no DNA, a transcrição de um grande número de genes envolvidos com o controle do crescimento e a diferenciação celulares é regulada (revisado por Berko-Flint, 1994).

Sabe-se que a concentração de GR (Cidlowisk e Cidlowisk, 1982), assim como os membros de AP-1 (Nishikura e Murray, 1987; Ryseck e cols, 1988), varia durante o ciclo celular e que TPA (12-*O*-tetradecanoilforbol- β -acetato), um éster de forbol, inibe a transcrição do gene de GR (Vig e Vedeckis, 1992). Além disso, uma região semelhante ao elemento AP-1 foi identificada no promotor do gene de GR humano (Zong e cols, 1990).

Estes dados apontam para um possível papel dos membros da família AP-1 na regulação da expressão de GR. Além disso, permitem sugerir que estas proteínas sejam pelo menos um dos alvos de Ras no nosso sistema.

Experimentos de transfecção transitória, preliminares a este trabalho, realizados em células NIH3T3 mostraram que a co-expressão tanto de *c-jun* como de *v-jun*, ao contrário de outros membros da família AP-1, como *junB*, *junD* e *c-fos*, fazia reduzir a atividade do promotor do gene de GR humano de forma dose dependente (Martins e cols, não publicado).

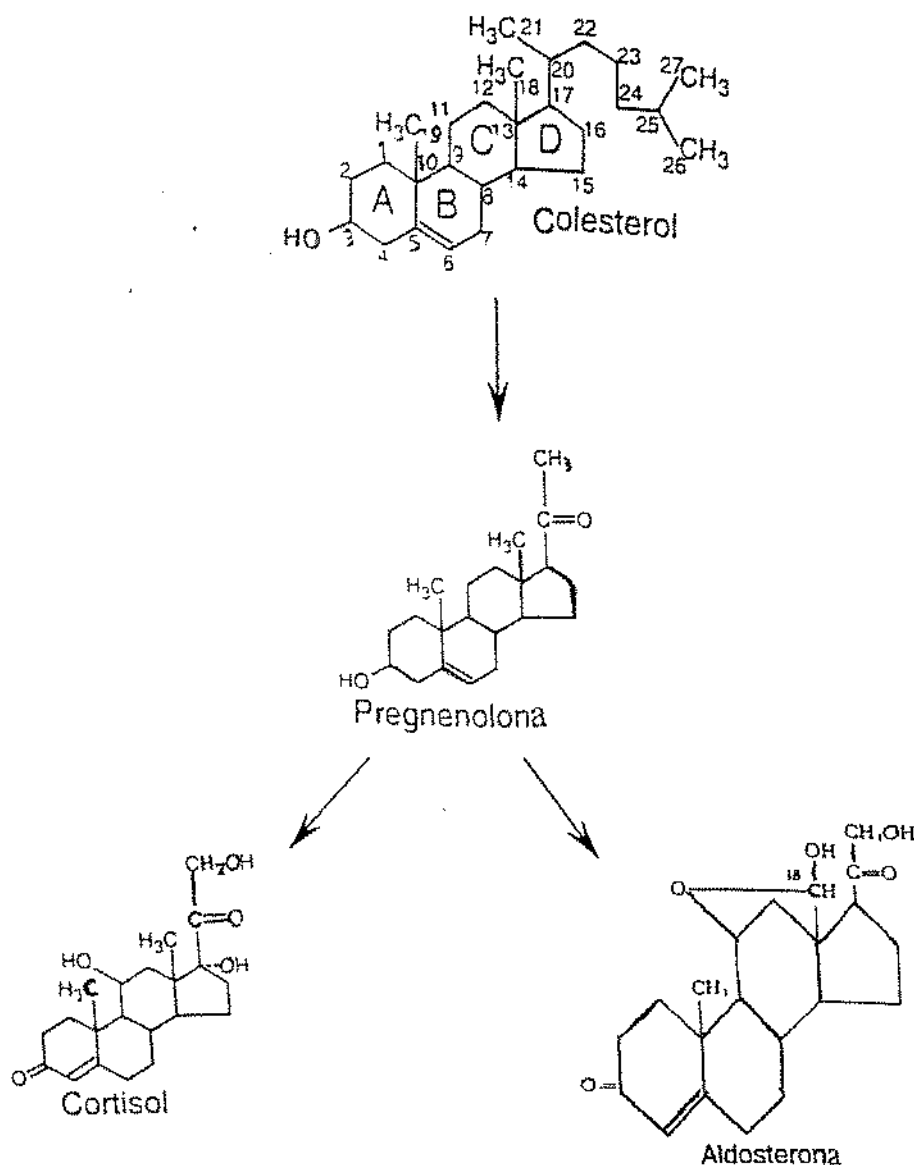
Partindo destas evidências, iniciou-se o presente trabalho na tentativa de avaliar a regulação endógena do promotor do gene do receptor de glicocorticóide de camundongo pela proteína c-Jun.

Com esta finalidade, células da linhagem 3T3 de fibroblastos de camundongo foram co-transfectadas com os vetores pRSVc-*jun* e pSV2neo (resistência a neomicina), de onde isolaram-se clones denominados NIH3T3c-*jun*, resistentes ao antibiótico selecionador.

Estes clones foram analisados quanto a expressão dos RNA mensageiros de *c-jun* e de GR por ensaios de “Northern blot”, tendo suas proteínas Jun e GR foram quantificadas respectivamente por ensaios “Western blot” e de ligação ao hormônio radioativo.

Baseando-se ainda nos dados de Zong e cols (1990), que identificaram uma sequência semelhante a AP-1 no promotor de GR humano, foram realizados ensaios de retardamento de mobilidade eletroforética (“eletrophoretic mobility shift assay”). Estes tiveram como finalidade determinar se a ligação de c-Jun à esta região do promotor seria tão específica e forte a ponto de poder regular a transcrição do gene de GR e desta forma diminuir as concentrações da proteína receptora.

A



B

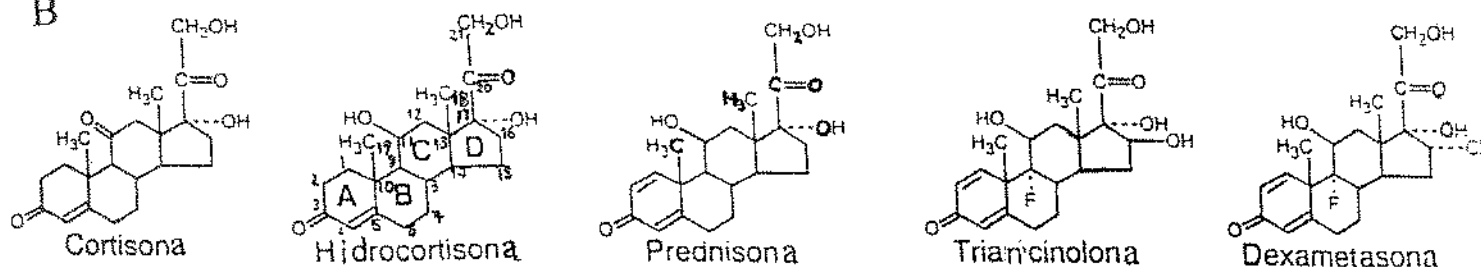
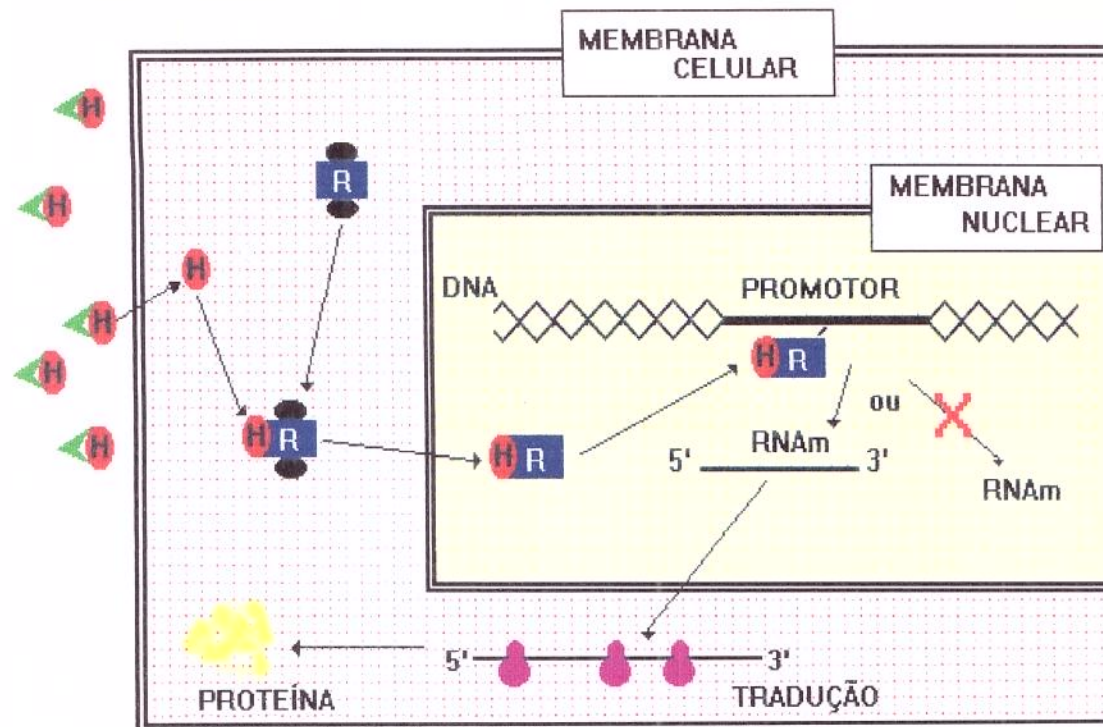


ILUSTRAÇÃO 1

A- Biossíntese simplificada dos corticosteróides que mostra os dois compostos principais representativos dos grupos dos mineralocorticóides (aldosterona) e dos glicocorticóides (cortisol). B- Representação de derivados sintéticos da hidrocortisona (ou cortisol) evidenciando que as estruturas não são completamente planares (linhas pontilhadas que se projetam do plano). Os grupos ligados aos anéis esteróidicos são importantes determinantes da especificidade da atividade biológica exercida.

A



B

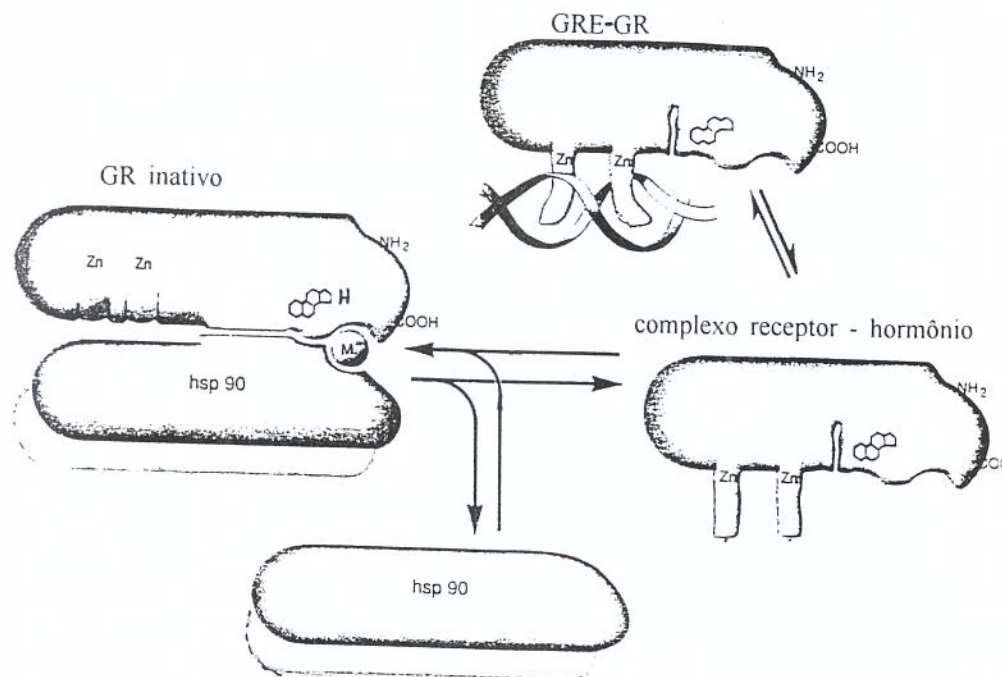


ILUSTRAÇÃO 2

A- Mecanismo de ação do hormônio glicocorticóide. Em verde está representada a proteína sérica transportadora do hormônio (H). Após a entrada na célula este se associa ao receptor (R) que permanecia inativo devido associação a proteínas de choque térmico (em preto). A liberação destas permite que o complexo migre para o núcleo onde funcionará como fator de transcrição induzindo ou reprimindo a transcrição de determinados genes. B- Interação de GR com a proteína de choque térmico hsp 90, estabilizada por molibdato (M), evidenciando que a ligação do hormônio (H) leva à dissociação deste complexo. O GR é então capaz de interagir com regiões específicas do DNA (GRE) através de domínios denominados “dedos de zinco” (Scherrer e cols, 1993).

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Amplificação dos vetores de expressão (Sambrook & cols, 1989)

1.1- Crescimento e transformação de bactérias competentes (Mandel e Higa, 1970; Cohen e cols, 1972; Oishi e Cosloy, 1972)

Bactérias E. coli cepa HB101 (GIBCO-BRL Gaithersburg, M.D. USA) foram crescidas em meio LB (5g/l extrato de levedura, 10g/l triptona e 5g/l de NaCl pH 7,2). Triptona e extrato de levedura foram adquiridos da INTERLAB SP, Brasil. Ao atingir a fase exponencial de crescimento (DO de 0,3) puderam ser tornadas competentes a partir do tratamento com CaCl_2 : centrifugou-se a cultura, lavou-se o precipitado com solução A (10mM MOPS pH 6,5; 10mM RbCl_2), e ressuspendeu-se em solução B (CaCl_2 50mM, 10mM MOPS pH 6,5; 10mM RbCl_2); na quantidade de 1/4 do volume total usado para o crescimento, seguiu-se uma incubação à 4°C por 20 minutos. Estas bactérias são ditas competentes e puderam ser estocadas em solução B mais 10% de glicerol (MERCK Darmstadt, Alemanha) à -70°C.

Alíquotas de 20 μl de bactérias competentes foram incubadas a 4°C por 30 min com 200 ng do plasmídeo de interesse:

<u>Plasmídeo</u>	<u>Gene codificado</u>	<u>Referência</u>
pSV ₂ neo	Aminoglicosídeo fosfotransferase	Southern e Berg, 1982
pRSVc- <i>jun</i>	<i>c-jun</i>	Doucas e cols, 1991
pSV2WREC	GR	Danielsen e cols, 1986
phGRprom	cloranfenicol acetiltransferase	Zong e cols, 1990
CAT		
pCMVβgal	β galactosidase	MacGregor e Caskey, 1985
pGPDN5	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	Fort e cols, 1985

A isto seguiu-se um choque térmico à 42°C por 60 segundos. As bactérias receberam então 1ml de meio LB e permaneceram por 1 hora à 37°C. Estas foram plaqueadas em LB contendo 15 g/l de bacto ágar (INTERLAB SP, Brasil) e o antibiótico selecionador: ampicilina 100 µg/ml. As bactérias resistentes sofreram mais duas passagens para novo meio sólido com antibiótico e só então foram mantidas em estoque à -70°C para posterior crescimento em larga escala.

1.2- Crescimento de bactérias em larga escala e isolamento do DNA plasmidial (Birnboim e Doly, 1979; Ish-Horowicz e Burke, 1981, modificados)

Suspensões de bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse foram crescidas em 250ml de LB + ampicilina (100 µg/ml) à

37°C por 14 horas, em agitação constante. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 6.000xg por 15 minutos à 4°C, lavadas com STE (10mM Tris.HCl pH8, 1mM EDTA, 100mM NaCl) e ressuspensas em 10ml de solução I (50 mM glicose, 25mM Tris.HCl pH 8, 10 mM EDTA) mais 10 mg/ml de lisozima (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, M. O. USA) recém preparada. Após 20 minutos à 4°C, 20ml da solução II (0,2N NaOH, 1% SDS) foram adicionados lentamente até lise total das bactérias. Acrescentou-se então 15ml de solução III (acetato de potássio 3M pH5,5). As amostras foram incubadas por 15 minutos à 4°C e a seguir centrifugadas a 20.000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi recuperado e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto durante 1 hora à - 20°C. O DNA foi recuperado por centrifugação a 20.000xg por 20 minutos, a 4°C, e seco.

1.3- Purificação do DNA plasmidial por centrifugação de equilíbrio em cloreto de cério (Ausubel e cols, 1994)

O precipitado de DNA obtido no sub-ítem 1.2 foi ressuspensão em 4ml de TE pH 8 (10mM Tris.HCl, 1mM EDTA) e a esta solução foi adicionado 4,4 g de cloreto de cério e 0,4 ml de brometo de etídeo 10 mg/ml (ambos da SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, M. O. USA). O gradiente de cloreto de cério foi formado após centrifugação a 350.000xg por 14 horas num rotor Beckman VTi80. A banda inferior correspondente ao DNA plasmidial foi removida do tubo por sucção

com uma agulha 20G. O brometo de etídeo foi removido por extrações sequenciais com álcool isoamílico. Adicionou-se então 3 volumes de água, uma concentração final de 0,3M de acetato de sódio e 2 volumes de etanol. O DNA pôde então ser recuperado por centrifugação a 20.000xg por 20 minutos à 4°C, reprecipitado e ressuspenso em água.

A concentração do DNA foi determinada após leitura no comprimento de onda de 260nm (1DO = 50µg/ml) e sua pureza dada pela relação 260/280nm que foi sempre superior a 1,8.

2- Cultivo de células

A linhagem NIH3T3 derivada de fibroblastos de camundongo da raça suíça foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM da SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, M. O. USA) contendo 1,2 g/l de NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (CULTILAB SP, Brasil). Os clones de células NIH3T3 *c-jun* foram mantidos no mesmo meio de cultura que as parentais sendo que a concentração de soro utilizada dependeu de cada ensaio específico.

Toda cultura foi mantida em estufa à 37°C com atmosfera constante de 5% de CO₂.

3- Transfecção celular estável

O método descrito por Chen e Okayama (1988) permite que o DNA seja introduzido na célula por precipitação com fosfato de cálcio.

As células foram plaqueadas um dia antes da transfecção de forma que, no dia da transfecção, sua confluência atingiu 60%. Duas horas antes da transfecção as células receberam DMEM fresco suplementado com 10% de FBS.

Os DNAs transfectados, *c-jun* ($0,13\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e pSV₂neo ($0,013\mu\text{g}/\text{cm}^2$), foram precipitados previamente com etanol e ressuspensos em 450 μl de água estéril mais 50 μl de 2,5M de CaCl₂. Um volume de 500 μl de tampão 2x HeBs (0,28M NaCl, 50 mM Hepes, 1,48mM Na₂HPO₄ pH 7,05) foi gotejado sob esta solução e agitado lentamente. Após 20 minutos à temperatura ambiente, a suspensão foi adicionada às placas de forma que seu volume fosse 1/10 do meio de cultura. Procedeu-se uma incubação por 16 horas à 37°C. Após este período o meio foi desprezado e as células foram submetidas a um choque de glicerol (10% glicerol em DMEM) por 60 segundos. A seguir, as células foram re-alimentadas com meio DMEM fresco acrescido de 10% de FBS.

Dois dias após a transfecção as células foram repicadas em uma diluição de 1:15 e selecionadas com 0,5mg/ml de neomicina (G418 da GIBCO-BRL Gaithersburg, M.D. USA) durante 12 dias. Colônias independentes foram recolhidas das placas com o uso de anéis de clonagem e plaqueadas isoladamente. Parte das células de cada clone foi congelada para manutenção do estoque e a outra parte foi utilizada nos experimentos.

4- Transfecção celular transitória

Para as transfecções transitórias células NIH3T3 foram co-transfectadas com o plasmídeo contendo o gene codificador de c-Jun (pRSVc-*jun*) em concentrações crescentes de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 $\mu\text{g}/150\text{cm}^2$ mais 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do plasmídeo contendo o gene codificador da enzima cloranfenicol acetil-transferase (CAT) sob controle do promotor de GR humano (phGRpromCAT) e 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do plasmídeo codificador da β -galactosidase (pCMVB-gal). Este procedimento foi realizado como o descrito anteriormente à exceção da suplementação de soro que após o choque de glicerol foi de 1% em DMEM fresco. Após 48 horas da transfecção, as células foram removidas com a ajuda de um policial de borracha e lavadas duas vezes com PBS. O precipitado celular de uma garrafa de 150 cm^2 foi ressuspensão em 180 μl de 0,25M Tris.HCl pH 7,5 e lisado por quatro ciclos de congelamento/descongelamento (gelo seco mais etanol/37 $^{\circ}\text{C}$). O lisado foi centrifugado a 22.000xg por 15 minutos à 4 $^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante recuperado.

5- Dosagem da atividade de β -galactosidase (Sambrook e cols, 1989)

Uma alíquota de 30 μl do extrato celular obtido no item 4 foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ com 3 μl de solução 100x Mg (0,1M MgCl_2 , 4,5M β -mercaptoetanol), 66 μl o-nitrofenil-D-galactopiranosídeo (4 mg/ml em fosfato de sódio 0,1M pH 7,5) e 201 μl de fosfato de sódio 0,1M pH 7,5. A reação foi finalizada pela adição de 0,7ml de Na_2CO_3 1M. A atividade da enzima foi determinada pela leitura do produto da reação no

comprimento de onda de 420nm, que apresenta valores lineares de densidade óptica (DO) entre 0,2 e 0,8. A atividade enzimática pode então ser expressa em DO/min/ml extrato, sendo que o tempo considerado foi aquele computado durante cada reação.

Estes valores foram utilizados para normalização da eficiência de transfecção nos vários grupos.

6- Dosagem da atividade de CAT (Gorman e cols, 1982, modificado por Sambrook e cols, 1989)

O restante do extrato celular obtido no item 4 foi aquecido à 65°C por 10 minutos e centrifugado a 22.000xg por 15 minutos à 4°C. Segundo Crabb e Dixon (1987) este tratamento leva a um aumento de sensibilidade da dosagem da atividade de CAT. O sobrenadante recuperado foi ensaiado, depois de ter seus volumes normalizados pela atividade de β -galactosidase (dosada como descrito no item 5), que foi o controle interno da eficiência de transfecção.

Amostras destes extratos contendo a mesma atividade total de β -galactosidase (item 5) foram incubadas com acetil Coenzima A 0,5mM (concentração final), Tris.HCl 0,25M pH7,5 (concentração final) e 4 μ l de 0,025 μ Ci/ μ l [14 C] cloranfenicol (50-60 mCi/mmol), à 37°C, por 2 horas. O cloranfenicol e seus produtos acetilados foram extraídos com 1ml de acetato de etila que posteriormente foi evaporado com o uso de um "speed vac" (Savant). Cada amostra pôde ser então ressuspensa em 20 μ l de acetato de etila e aplicada a uma placa de gel de sílica poliéster. Os produtos acetilados foram separados em um tanque de cromatografia

com 350ml de uma solução contendo clorofórmio/metanol (95:5). Um filme de raio X (KODAK SP, Brasil) foi exposto à placa até obtenção de sinal adequado. Para melhor quantificação, as bandas dos produtos acetilados foram recortadas da placa de sílica e sua radioatividade avaliada em um contador de cintilação líquida Beckman LS 6800.

7- Isolamento do RNA celular (Cox, 1968; Glisin e cols, 1973; Puissant e Houdebine 1990; Ausubel e cols, 1994)

As células foram crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS até a confluência em uma superfície de 150 cm², após o que foram lisadas com 3,5ml de solução de guanidina (4M isotiocianato de guanidina, 25mM acetato de sódio pH 7,0, 0,1M β-mercaptoetanol, 0,5% N-laurilsarcosina). O lisado viscoso foi passado 5 vezes através de uma agulha de 21G, para quebra do DNA cromossomal e diminuição de sua viscosidade. O lisado foi então colocado sobre um colchão de 1,5 ml de cloreto de cézio 5,7 M (dissolvido em 0,1M EDTA pH 8,0) e centrifugado a 25.000 rpm num rotor Beckman SW41, por 16 horas, à 15°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado contendo o RNA seco dissolvido em 0,3 ml de água, e reprecipitado com etanol absoluto. Após ser re-dissolvido em água a sua quantificação foi feita por leitura da densidade óptica a 260nm (1 DO= 40µg/ml de RNA). O RNA utilizado possuía uma razão 260/280 nm, que indica a pureza deste, sempre superior a 1,8.

8- "Northern blotting"

Este método descrito anteriormente por Housley e Forsthoefel (1989) foi efetuado para análise do RNA isolado dos clones celulares.

Foram misturadas amostras de 20 µg de RNA isolado com 5 µl de tampão MOPS 10x (0,2M MOPS pH 7,0; 0,05M acetato de sódio; 0,01M EDTA pH8,0), 8,75µl de formaldeído 37 % e 25 µl de formamida para um volume total de 50µl e incubadas por 15 minutos à 65°C. O RNA foi a seguir separado por eletroforese num gel de agarose 1,2% preparado com 10% do volume de tampão MOPS 10x e 3% de formaldeído 37%. O RNA foi então transferido por capilaridade com 20x SSC (3,0M NaCl, 0,3M citrato de sódio pH 7) para uma membrana de nylon (Hybond N da AMERSHAM INTERNATIONAL Buckinghamshire, Inglaterra) e ligado covalentemente a esta por exposição à luz ultravioleta por 4 minutos. As membranas foram pré-hibridizadas com 5x SSPE (0,75M NaCl, 0,05M NaH₂PO₄, 4mM EDTA pH7,4), 5x solução de Denhardt's (0,05 g/ml Ficoll 400, 0,05 g/ml polivinilpirolidona, 0,05 g/ml de soroalbumina bovina) 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão e 50% de formamida, durante 20 horas, à 42°C. A hibridização das membranas foi feita da mesma forma, a não ser pelo acréscimo de 10% de sulfato de dextrana e a sonda radioativa.

Os fragmentos de 1,0 Kb do plasmídeo pSV₂WREC/Hind III (Danielsen e cols, 1986) e o plasmídeo pRSVc-*jun* (Doucas e cols, 1991) foram utilizados como sondas para detecção dos RNAs mensageiros de GR e c-*jun*, respectivamente. O plasmídeo pGPDN5 (Fort e cols, 1985) foi usado como sonda para o RNAm de GAPDH, que serviu como controle interno para normalização da quantidade de

RNA total usado para cada amostra. Os DNAs utilizados como sonda foram marcados com [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP pelo método de "random priming" (Feinberg e Vogelstein, 1983) usando o kit "random primer" da GIBCO-BRL Gaithersburg, M.D. USA. Cada membrana recebeu 2 x 10^6 cpm de sonda /ml de solução ou 10^9 cpm/ μg de DNA marcado. Após a incubação, as membranas foram lavadas 2 vezes com SSPE 2x (0,3M NaCl, 0,02M NaH_2PO_4 , 2mM EDTA pH 7,4) /0,1% SDS, 2 vezes com SSPE 0,2x/0,1% SDS e 2 vezes com SSPE 0,1x/0,1% SDS. Todas as lavagens foram efetuadas por 15 minutos sendo as com SSPE 2x ou 0,2x à temperatura ambiente e as com SSPE 0,1x à 52°C. Filmes de raio X (KODAK SP, Brasil) foram expostos às membranas à -70°C até obtenção de sinal adequado. Os sinais impressionadas no filme foram quantificadas em um densitômetro LKB ULTROSAN XL da PHARMACIA Uppsala, Suíça. Os valores normalizados do mRNA de interesse foram dados pela razão entre o sinal apresentado pela amostra após hibridização com a sonda adequada e o valor apresentado após hibridização com o DNA do controle interno: GAPDH.

9- Quantificação do receptor de glicocorticóide

9.1- Preparo de extratos celulares (Martins e Brentani, 1990, modificado)

Células crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS até a confluência foram removidas das garrafas com uso de um policial de borracha, lavadas duas vezes com PBS (1,5mM KH_2PO_4 , 137mM

NaCl, 3mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ pH7,4) e ressuspensas em TH (10mM Hepes pH 7,35, 20mM molibdato de sódio e 1mM EDTA), após o que foram congeladas em gelo seco mais etanol e descongeladas à 4°C por 5 ciclos e centrifugadas a 22.000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante formado foi denominado citosol e sua concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

9.2 -Ligação ao hormônio radioativo (Martins e Brentani, 1990)

Alíquotas de 45µl de citosol foram incubadas em triplicata com 5µl de [³H] Dexametasona com atividade específica de 84 Ci/mmol (AMERSHAM INTERNATIONAL Buckinghamshire, Inglaterra) diluída em etanol 20% para concentração final de 20×10^{-9} M, na presença ou ausência de concentrações 200 vezes maiores de Dexametasona radioinerte. Após incubação de 3 horas, à 4°C, seguiu-se adição de 75µl de uma suspensão de carvão dextrana (2,5% carvão, 0,25% dextrana T70, em etanol 75%) adquirida da WIEN LABORATORIES INC Succasunna, N. J., USA. Após 10 minutos de incubação à 4°C e centrifugação a 22.000xg, alíquotas de 100 µl do sobrenadante foram retiradas e sua radioatividade avaliada em um contador de cintilação líquida Beckman LS 6800.

A quantificação do número de receptores de glicocorticóide foi feita segundo descrito por Scatchard (1949).

10- Quantificação da proteína c-Jun

10.1- Preparo de extrato celular (Sambrook e cols, 1989, modificado)

Para este ensaio foram utilizadas células NIH3T3 e NIH3T3 *c-jun* crescidas em garrafas de 150cm², até a confluência em DMEM acrescido de 10% de FBS, células NIH3T3 crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS e carenciadas por 48 horas em DMEM acrescido de 1% de FBS e células reestimuladas com DMEM acrescido de 20% de FBS após a carência.

As células foram removidas das garrafas com auxílio de um policial de borracha e lavadas duas vezes com PBS. O precipitado foi então ressuspensão em 100 µl de tampão RIPA (10mM Tris HCl pH 7,5; 150mM NaCl ; 1% Nonidet P40; 1% deoxicolato de sódio) acrescido de 1mM fenil metil sulfonil floride (PMSF), 1mM benzamidina, 1mM leupeptina e 1mM aprotinina (todos da SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, M. O. USA) e deixado a 4°C em agitação constante. Após 30 minutos, o lisado foi fervido por 5 minutos, centrifugado a 22000xg por 15 minutos e o sobrenadante recuperado. A este, foi adicionado mais 1mM dos inibidores de protease e o extrato celular pôde ser então estocado à -70°C, sendo dosada a proteína pelo método de Bradford (1976) antes de cada ensaio.

10.2- Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Laemmli, 1987) e quantificação da proteína Jun com anticorpo específico (“Western blot”) (Towbin e cols, 1979; Burnette, 1981)

Aliquotas dos extratos celulares contendo 100µg de proteína total foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida (10%) em tampão 2,5mM Tris pH 7,4, 19mM glicina, 0,1% SDS. O gel foi então transferido para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (20mM Tris pH 7,4, 150mM glicina e 20% de metanol) por no mínimo 12 horas, e esta corada com reagente de Ponceau (0,2% em água). A membrana foi então bloqueada em 5% de leite desnatado

(Molico) em TBST (20mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20), por 2 horas, a temperatura ambiente. Estas foram a seguir incubadas com anticorpo de coelho específico contra c-Jun 100µg/ml (SC45- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Califórnia, USA) na diluição 1:200 em TBST, por 2 horas, a temperatura ambiente. Seguiram-se então 3 lavagens com TBST, 10 minutos cada, a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas a seguir com o anticorpo anti-coelho peroxidase (Kit ECL da AMERSHAM INTERNATIONAL Buckinghamshire, Inglaterra) na diluição 1:1000 em TBST, a temperatura ambiente, por 1 hora. Seguiram-se mais três lavagens com TBST, 10 minutos cada a temperatura ambiente. O ensaio foi revelado por intermédio de uma reação de quimioluminescência segundo as determinações do Kit. Filmes de raio X (KODAK SP, Brasil) foram expostos às membranas por períodos curtos de tempo (1 a 5 minutos) durante a emissão de luz proveniente da reação

química do luminol (Isacson e Watermark, 1974; Rosewell e White, 1978; Whitehead e cols, 1979) e as bandas impressas foram quantificadas por densitometria.

Cabe aqui a explicação de que para cada gel foi corrido o controle de células NIH3T3 normais crescidas até a confluência em 10% de FBS. A quantificação por densitometria das bandas impressas no filme foi sempre relativa ao controle de células NIH3T3 em 10% de FBS na confluência.

11- Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética (Ausubel e cols, 1994)

11.1- Preparo de extrato nuclear (Dignam e cols, 1983; Ausubel e cols, 1994)

Células NIH3T3 e NIH3T3 *c-jun* crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS até a confluência, foram retiradas das garrafas e lavadas com PBS. Após o que foram lisadas em tampão hipotônico (10mM Hepes pH 7,9 à 4°C, 1,5mM MgCl₂. 6H₂O, 10mM KCl, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT) e homogeneizadas em um triturador de tecido com pistilo de teflon (THOMAS COMPANY Philadelphia, P. A., USA).

Os núcleos foram obtidos por centrifugação a 1500xg, lavados em tampão hipotônico e re-centrifugados a 1500xg. O precipitado de núcleos foi então ressuspenso em tampão de baixa concentração salina (20mM KCl, 20mM Hepes pH 7,9 à 4° C , 25% glicerol, 1,5 mM

MgCl₂, 0,02mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT) e posteriormente adicionado lentamente tampão de alta concentração salina (1M KCl, 20mM Hepes pH 7,9 à 4° C , 25% glicerol, 1,5 mM MgCl₂, 0,02mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT) na proporção 1:2. A mistura permaneceu sob agitação constante por 30 min à 4°C.

O sobrenadante, após centrifugação, constitui o extrato nuclear contendo a proteína c-Jun. Este extrato apresentava alta concentração salina sendo, portanto, dialisado contra tampão de diálise (100mM KCl, 20mM Hepes pH 7,9 à 4° C , 20% glicerol, 1,5 mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mMDTT) por 2 horas e sua condutividade constantemente monitorada até se obter concentração salina igual à do tampão de diálise.

11.2- Immunodepleção

Alíquotas dos extratos nucleares foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho contra c-Jun (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Califórnia, USA), à 4°C, por 16 horas. Foi, então, adicionada às amostras proteína A sepharose (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, M. O. USA) equilibrada com tampão Tris 100mM pH 7,4 e estas incubadas sob agitação constante por 2 horas à 4°C. O complexo de c-Jun/anticorpo ligado à proteína A sepharose foi desprezado e o sobrenadante, subtraído apenas de c-Jun, foi utilizado nos ensaios de mobilidade eletroforética.

11.3- Ensaio de mobilidade eletroforética (Fried e Crothers, 1981; Garner e Revzin, 1981; Hendrickson e Schleif, 1984)

Foram sintetizadas no Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer- SP as seqüências do DNA simples fita contendo o elemento AP-1 não consenso contido no promotor de GR humano: 5'-TCGAAGTTGACACACTTCACGC-3' e 3'- AGCTTCACTGAGAG AAGTGCG- 5'. Estas foram separadamente ressuspensas em 10mM Tris Hcl pH 7,6, aquecidas, por 5 minutos, a 100°C e imediatamente transferidas para um banho de gelo acrescido de etanol. Este processo permite a separação e linearização das fitas. Após isto as fitas de DNA foram misturadas e puderam ser aneladas por ciclos de temperatura: 7 minutos a 25°C, 15 minutos a 65°C, 20 minutos a 37°C e 20 minutos a 25°C.

O oligonucleotídeo então formado e os oligonucleotídeos de 21 pb (pares de bases em fita dupla), contendo as seqüências consenso de AP-1 (5'-CGCTTGA TGACTCA GCCGGAA-3') e AP-1 mutante (5'-CGCTTGATTGACTTGGCCG GAA-3'), adquiridos da SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Califórnia, USA, foram marcados na extremidade 5' por [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP pelo uso de T4 polinucleotídeo quinase. As reações de ligação foram realizadas pela mistura da preparação de extratos nucleares de células NIH3T3, NIH3T3c-*jun* 14, 26 e 36 ou E.82, uma linhagem de células L929 resistente a glicocorticóide (Housley e Forsthoefel, 1989) com alta expressão de c-Jun, com os oligonucleotídeos dupla fita marcados. A incubação foi realizada por 20 minutos, à temperatura ambiente, e continha 0,5ng de DNA marcado, 5µg de extrato nuclear em tampão HEGK (25mM Hepes pH 7,35, 10%

glicerol, 1mM EDTA, 70mM KC, 1mM DTT) e 3 µg de poli dI-dC, para um volume final de 60 µl com tampão HEGK.

As amostras foram aplicadas em gel não desnaturante 4% de poliacrilamida em tampão de amostra (67mM Tris, 33mM acetato de sódio, 10 mM EDTA, pH 8,0) e os complexos DNA-proteína separados por eletroforese à 100 Volts.

As autorradiografias foram obtidas após exposição de filmes Raio X (KODAK SP, Brasil) ao gel seco. As bandas correspondentes aos complexos foram quantificadas em um densitômetro LB ULTROSCAN da PHARMACIA Uppsala, Suíça.

11.4- Competição

Para este ensaio foi utilizado extrato nuclear de células NIH3T3 crescidas até a confluência em DMEM acrescido de 10% de FBS.

A reação foi realizada incubando-se 5µg do extrato com 0,5 ng do oligonucleotídeo com a sequência de AP-1 consenso marcada como descrito anteriormente e concentrações crescentes de 1,25; 2,5; 3,75; 5 e 10ng de AP-1 consenso, AP-1 mutante e o AP-1 presente no promotor do gene de GR humano radioinertes (correspondentes a 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 vezes mais, a concentração do oligonucleotídeo radioativo).

Após a separação dos complexos DNA-proteína por eletroforese o gel foi seco e exposto a um filme de Raio X. As bandas correspondentes a estes complexos foram quantificadas usando-se um densitômetro LB ULTROSCAN da PHARMACIA Uppsala, Suíça.

RESULTADOS

Tendo como finalidade a determinação da atividade de c-Jun, um dos possíveis alvos de Ras na regulação do gene do receptor de glicocorticóide, ensaios de transfecção transitória foram inicialmente realizados.

Células NIH3T3 foram co-transfectadas com o plasmídeo “reporter” contendo o gene CAT sob controle do promotor do gene de GR humano e concentrações crescentes do vetor de expressão de *c-jun*.

A figura 1 mostra que a co-transfecção de concentrações crescentes de *c-jun* faz diminuir, de forma dose-dependente, a transcrição do gene CAT. A inibição máxima foi atingida quando uma concentração de 10 µg/150cm² de DNA de *c-jun* foi transfectada.

Estes dados permitem sugerir que c-Jun é capaz de inibir a transcrição do gene de GR humano possivelmente por atenuar a atividade do seu promotor.

Baseado nestes dados preliminares o estudo da regulação do gene do GR endógeno por *c-jun* foi iniciado.

Clones de células NIH3T3 *c-jun* foram gerados por ensaios de transfecção estável onde inseriu-se em células NIH3T3 o plasmídeo contendo a seqüência do gene de *c-jun* sob controle do promotor de SV40, que permite uma expressão alta e constitutiva, e o plasmídeo que confere resistência à neomicina (pSV2neo) para posterior seleção dos clones.

Os clones foram gerados com a finalidade de se avaliar a expressão do gene de GR por quantificação do seu RNA mensageiro

(RNAm) e da proteína correspondente em células que expressassem constitutivamente diferentes concentrações da proteína Jun.

Após 12 dias de seleção em G418, 37 clones resistentes foram isolados. Cada um deles teve seu RNA total extraído e estes foram então analisados quanto a expressão dos RNAm de *c-jun* (2,7 Kb) e de GR (7,1 Kb) utilizando-se sondas radioativas de DNA. O plasmídeo contendo a sequência que codifica o gene da gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) de 1,2 Kb foi utilizado como controle interno na normalização da quantidade de RNA total aplicado em cada canaleta do gel.

As figuras 2, 3, 4 e 5 mostram os resultados obtidos e são formadas a partir da composição dos autorradiogramas provenientes da exposição de filmes de raio X às membranas após sua hibridização com cada uma das sondas separadamente. As bandas impressionadas no filme foram quantificadas por densitometria e os valores relativos à célula NIH3T3 parental crescida nas mesmas condições dos clones (representada na primeira linha de cada figura) foi calculado. Estes valores estão representados nas tabelas 1 a 4 e ilustrados no gráfico da figura 6.

Os valores para a expressão dos RNAm de *c-jun* e GR foram obtidos após a realização de apenas um ensaio de “Northern blot”, portanto foram considerados como tendo um aumento na expressão do RNAm de *c-jun*, clones com valores relativos superiores a 1,10 , ou seja, aqueles que apresentavam um aumento de mais de 10% na quantidade de RNAm expresso a partir do valor basal de 1 atribuído à célula parental. Os resultados mostram que as quantidades de RNAm de *c-jun* nos clones gerados variam entre 1,15 a 25,72 vezes a concentração deste

mensageiro nas células NIH3T3. Todos os clones apresentaram valores para RNAm de *c-jun* iguais ou maiores do que a célula parental, sendo que 95% (35 / 37) dos clones apresentam aumento deste RNAm.

A atenuação na expressão do gene de GR foi considerada nos clones cujas concentrações do seu RNAm foram menores que 0,90, ou seja, com no mínimo 10% a menos da concentração do RNAm de GR presente na célula parental.

Os resultados indicam que 92% (34 / 37) dos clones apresentam diminuição do RNAm de GR, considerando a faixa de valores estabelecida, e indicam fortemente que a transfecção de *c-jun* pode implicar em uma atenuação da expressão de GR (comparar os valores no gráfico da figura 6). Entretanto, pode-se observar que não há necessariamente uma relação inversa entre as quantidades de RNAm analisadas, ou seja, nem sempre quando há elevação dos valores relativos para o RNAm de *c-jun* há decréscimo proporcional do RNAm de GR. Esta afirmação pode ser melhor ilustrada quando se compara, por exemplo, os clones 10 e 24 (tabelas 1 e 2 respectivamente). O clone 10 apresenta quase 6 vezes mais RNAm de *c-jun* com relação à célula parental enquanto que o clone 24 tem expressão aumentada em 2,7 vezes. Apesar desta diferença ambos mostram atenuação semelhante de 70% (com valores relativos de cerca de 0,30) para o RNAm de GR.

Ao analisar ainda clones como o 17 (tabela 2), 25 (tabela 2) e 40 (tabela 4) constata-se que estes apresentam valores incluídos entre os mais elevados para o RNAm de *c-jun* (23,24; 25,72 e 22,82 respectivamente) e só os clones 17 e 25 apresentam redução semelhante da expressão do RNAm de GR (valores relativos de 0,38 e 0,39

respectivamente) enquanto que o clone 40 apresenta valor para o RNAm de GR igual à célula NIH3T3.

Dentre os clones que apresentam mais de 20 vezes RNAm de *c-jun* com relação à célula parental está ainda o clone 20 (tabela 2). Este exibe o segundo maior valor relativo para o RNAm de *c-jun* mas não apresenta proporcionalidade na redução do RNAm de GR. A expressão do RNAm de GR é semelhante por exemplo ao clone 26 (tabela 3) que apresentou apenas 1,66 vezes mais RNAm de *c-jun* do que a célula original.

Os ensaios de ligação ao hormônio radioativo para quantificação da proteína receptora de glicocorticóide foram realizados na tentativa de se relacionar a expressão elevada, ou não, do RNAm de *c-jun* dos clones, com variações que pudessem ocorrer a nível da proteína GR.

A concentração de receptores foi expressa em fmoles por mg de proteína total do citosol e os valores de cada clone foram calculados em relação à célula NIH3T3 crescida nas mesmas condições dos clones (tabela 5).

Pelo menos dois ensaios foram realizados com cada clone e foi considerado decréscimo da proteína receptora valores relativos inferiores a 0,90. Do total de 37 clones analisados, 18 (49%) apresentaram decréscimo da proteína GR (representados em vermelho na tabela 5).

Dos clones que apresentam aumento do RNAm de *c-jun*, 49 % (17 / 35) têm valores diminuídos da proteína GR.

Novamente pode-se observar que não existe uma relação proporcional entre o aumento do RNAm de *c-jun* e o decréscimo da proteína GR.

Ao comparar clones como o 7 e o 14 por exemplo, observa-se que ambos apresentam mais de três vezes RNAm de *c-jun* do que a célula parental. Enquanto o clone 7 apresenta concentração de proteína GR praticamente igual à célula normal, o clone 14 apresenta 91% (valor relativo de 0,09) menos proteína GR, constituindo o clone com menor concentração da proteína receptora em todo o grupo.

É interessante notar, ainda, que a expressão relativa do RNAm de GR nos diferentes clones também não é equivalente à da proteína receptora. Um exemplo para este fato é o clone 14 que apresenta expressão de RNAm de GR semelhante ao clone 23. No caso deste último a concentração da proteína GR é semelhante a da célula parental, enquanto que para o clone 14, como já foi mencionado, esta está reduzida em 91% (valor relativo de 0,09).

Vale ressaltar ainda, como um bom exemplo, que os valores relativos do RNAm de *c-jun* obtidos para os clones 9 (tabela 1), 18 , 21, 23 (tabela 2) e 38 (tabela 4) formam um grupo onde há aumento de mais de 10 vezes do RNAm de *c-jun*. Somente os clones 9 e 18 apresentam redução de aproximadamente 40% (valor relativo acima de 0,60) da proteína GR, enquanto que os demais apresentam valores semelhantes ao da célula parental. Ao se comparar os valores do RNAm de GR destes dois clones com os valores relativos da proteína GR, novamente ilustra-se o fato da não correspondência de eventos. Apesar de ambos possuírem concentrações semelhantes de proteína GR, o clone 9 apresenta valor para o RNAm de GR igual à célula NIH3T3 enquanto que o clone 18 (tabela 2) apresenta valor 52% menor (valor relativo de 0,48).

Segundo a proposta inicial, a regulação do gene de GR deveria ser mediada pela proteína Jun que atua como fator de transcrição. Portanto, a próxima abordagem experimental foi a quantificação da proteína Jun por ensaios de “Western blot” (figuras 7 a 11).

A figura 7 representa um experimento controle com extrato total de células NIH3T3 crescidas em 10 % de FBS (10%), de células NIH3T3 crescidas em 10% de FBS e carenciadas por 48 horas em 1% de FBS (C) e células NIH3T3 reestimuladas após a carência com 20% de FBS por 2 horas (E). Foram calculados os valores da carência e do estímulo em relação à célula crescida em 10% de FBS e estes podem ser encontrados relacionadas na própria figura.

Sabe-se que a expressão da proteína c-Jun é regulada ao longo do ciclo celular e aumenta na transição G0 / G1 (Ryseck e cols, 1988; Kovary e Bravo, 1992). Os resultados obtidos mostram que a célula carenciada (G0) apresenta concentrações basais de c-Jun e que estas aumentam 4,7 vezes após o estímulo com soro. A expressão de c-Jun em células crescendo em 10% de FBS tem valor relativo intermediário entre as células carenciadas e as estimuladas. Isto se deve ao fato das células deste grupo não estarem sincronizadas no ciclo celular.

A proteína c-Jun tem peso molecular descrito na literatura de cerca de 39 kDa e em alguns casos a banda correspondente a c-Jun pode se apresentar na forma de banda dupla, o que poderia representar modificações pós-traducionais de fosforilação da proteína (Papavassiliou e cols, 1995).

As figuras 8 a 11 mostram os ensaios de “Western blot” realizados com os diferentes clones tendo sempre células NIH3T3 crescidas em 10% de FBS como controle. As bandas obtidas nestes ensaios

apresentam-se tanto na forma de banda dupla como na forma de banda simples, sendo que as bandas correspondentes à banda dupla podem variar também em intensidade. A figura 8 ilustra estas várias formas da proteína c-Jun e é interessante notar que o clone 32 apresentou uma terceira banda localizada abaixo da banda dupla e com intensidade alta, o que poderia representar outra forma da proteína.

A tabela 6 apresenta um resumo geral de todos os valores de RNAs mensageiros e proteínas calculados de forma relativa à célula NIH3T3 crescida em 10 % de FBS onde, na última coluna, podem ser observados os valores da proteína c-Jun referentes à quantificação densitométrica das bandas representadas nas figuras 8 a 11. Vale ressaltar que a quantificação de c-Jun não constituiu um ensaio único, pois, para todos os clones, foram realizados por pelo menos dois experimentos independentes e os valores mostrados representam sua média aritmética.

Para o clone 32 a banda menor de cerca de 31 kDa não foi incluída na quantificação pois não se sabe ao certo se esta representa uma nova forma da proteína ou um produto de degradação.

Foram considerados aumento das concentrações de c-Jun valores relativos superiores a 1,10 , ou seja, aqueles que apresentavam quantidades de c-Jun maiores que 10% da apresentada pela célula parental. Da mesma forma considerou-se diminuição de c-Jun os valores relativos abaixo de 0,90.

A análise dos dados mostrou que 47% (17 / 36) dos clones possui proteína Jun aumentada. Como observado anteriormente, entre o RNAm de GR e a proteína por ele codificada, não existe

necessariamente uma relação proporcional entre o RNAm de c-Jun e a sua respectiva proteína.

É interessante notar que dos clones que apresentam aumento da proteína Jun, 94% (16 / 17) têm valores de RNAm de GR diminuído. A proteína GR está diminuída em 53% (9 / 17) destes clones.

Resultados inesperados inicialmente mostraram que apesar da maioria dos clones apresentar aumento do RNAm de c-Jun, 44% (16 / 36) do total de clones analisados possuíam valores para a proteína c-Jun menores que a célula parental. Vale lembrar que, dentro da faixa de segurança de 10% estabelecida (valores relativos entre 0,9 e 1,1), 3 clones do total de 36 analisados apresentaram expressão de proteína Jun igual à célula parental.

Os clones 6, 8, 11, 14, 16, 18, 25 e 26 (representados em vermelho na tabela 6) que representam 22% do total de 36 clones analisados, apresentam aumento da proteína c-Jun e diminuição tanto de RNAm quanto da proteína GR, como era esperado no início do trabalho. Os clones 6, 8, 11, 14, 25 e 26 apresentam concentrações da proteína c-Jun superiores às apresentadas pela célula NIH3T3 estimulada (figura 7), portanto, com valores de c-Jun constitutivos e superiores ao máximo expresso pelas células parentais.

Uma das evidências iniciais que nos levou a proposição do envolvimento de c-Jun na regulação do gene de GR, foi a demonstração da presença de um elemento semelhante a AP-1 na sua sequência promotora (Zong e cols, 1990).

Ensaio de mobilidade eletroforética foram realizados na tentativa de determinar se c-Jun era capaz de reconhecer o elemento semelhante a

AP-1 presente no promotor do gene de GR, ou seja, mediar a regulação da transcrição do gene de GR por este mecanismo.

Esta abordagem experimental consiste em separar eletroforéticamente, em um gel de poliacrilamida, o oligonucleotídeo radioativo, correspondente à sequência de DNA de interesse, do complexo formado entre este e a proteína ligante, no caso c-Jun presente no extrato nuclear. Se houver ligação direta DNA-proteína, o complexo resultante migra menos em relação ao oligonucleotídeo isolado.

Foram testados os oligonucleotídeos dupla fita contendo a sequência AP-1 consenso (5'-TGACTCA-3'), a sequência AP-1 presente no promotor de GR (5'-TGACACA-3') (Zong e cols, 1990), que varia em um par de bases da sequência consenso (mostrado em negrito) e um terceiro oligonucleotídeo usado como controle (5'-TGACTTG-3'), que apresenta uma mutação em dois pares de bases (mostrado em negrito) com relação à sequência AP-1 consenso, o que diminui drasticamente sua capacidade de ligação a c-Jun (Lee e cols, 1987).

Os ensaios foram realizados com extratos nucleares de células E8.2 (figura 12), NIH3T3 (figura 13) e com os clones NIH3T3 *c-jun* 14 (figura 14), NIH3T3 *c-jun* 26 (figura 15) e NIH3T3 *c-jun* 36 (figura 16).

As células E8.2, derivadas de fibroblastos de camundongo L929 resistentes a glicocorticóide (Housley e Forsthoefel, 1989), apresentaram altas concentrações da proteína Jun e assim como as células NIH3T3 foram utilizadas com a intenção de se obter um extrato nuclear que pudesse ser usado na padronização e controle dos ensaios que posteriormente seriam realizados com os clones.

Os clones 14, 26 e 36 foram escolhidos com base nos dados obtidos a partir da quantificação dos RNAm e das proteínas de Jun e GR. O clone 14 apresentou um aumento dos valores relativos tanto do RNAm quanto da proteína c-Jun (valores relativos de 3,04 e 2,32 respectivamente) e uma redução de 47 % no RNAm de GR (valor relativo de 0,53) com relação à célula normal. O clone 26 difere do 14 por apresentar uma redução menos drástica do RNAm de GR (0,84) apesar de possuir concentrações semelhantes da proteína Jun (2,46). Por fim, o clone 36 , apesar de apresentar um valor relativo do RNAm de *c-jun* maior (7,11) do que os clones 26 e 14 não apresenta redução a nível de RNAm de GR (1,06) ou mesmo da proteína receptora (1,47).

Os ensaios foram realizados com o oligonucleotídeo dupla fita contendo a sequência consenso (linhas 1-4 da figura 12 e 1-3 das figuras 13, 14, 15 e 16), com o oligonucleotídeo contendo a sequência mutada (linhas 5 e 6 da figura 12 e 4-6 das figuras 13, 14, 15 e 16) e com o oligonucleotídeo contendo a sequência semelhante a AP-1 presente no promotor de GR humano (linhas 7-10 das figuras 12 e 13 e linhas 7-9 das figuras 14, 15 e 16). Estes oligonucleotídeos foram incubados na ausência de extrato nuclear (linhas 1, 5 e 7 da figura 12, linhas 1, 4, e 7 das figuras 13 e 14 e linhas 3, 4, e 7 das figuras 15 e 16), ou com 5 µg do respectivo extrato (linhas 2, 6, e 8 da figura 12, linhas 2, 5, e 8 das figuras 13 e 14 e linhas 1, 5, e 8 das figuras 15 e 16).

Podemos observar que a banda de menor migração no gel, que representa o complexo oligonucleotídeo-proteína, é menos intensa para o AP-1 presente no promotor de GR e o AP-1 mutante que para o AP-1

consenso. Estes resultados foram semelhantes para as células E8.2 (figura 12), NIH3T3 (figura 13) e para os três clones de NIH3T3 *c-jun* estudados (figuras 14, 15 e 16). O que sugere que a ligação da proteína c-Jun com o elemento AP-1 contido no gene do promotor de GR é menor do que a apresentada ao elemento AP-1 consenso e se assemelha muito com aquela obtida utilizando-se a sequência AP-1 mutante.

Além das associações do extrato nuclear íntegro com os oligonucleotídeos em estudo, foram testados também extratos nucleares imunodepletados de c-Jun pelo tratamento prévio destes com um anticorpo anti-c-Jun e proteína A sepharose. Estes ensaios confirmam que as bandas obtidas representam realmente a ligação de Jun aos respectivos elementos, pois ao imunodepletarmos c-Jun dos extratos com o anticorpo específico a banda desaparece (linhas 4 e 9 da figura 12, linhas 3, 6 e 9 das figuras 13 e 14 e linhas 2, 6 e 9 das figuras 15 e 16).

Foi utilizado também como controle para estes ensaios um teste de competição onde foram incubados com o extrato nuclear, o oligonucleotídeo consenso marcado radioativamente e 100 vezes mais do mesmo oligonucleotídeo radioinerte (linhas 3 e 10 da figura 12 e linha 10 da figura 13). Este acréscimo do respectivo oligonucleotídeo radioinerte inibiu completamente o sinal, indicando uma interação específica entre c-Jun e o elemento AP-1 consenso.

A tabela 7 mostra os valores relativos da ligação de c-Jun a AP-1 consenso (AP-1c), AP-1 mutante (AP-1m) e do AP-1 presente no promotor de GR (AP-1 GRprom), realizados a partir da análise densitométrica das bandas obtidas. Em qualquer das linhagens ou clones

analisados a ligação de c-Jun ao AP-1 GRprom é semelhante ao AP-1 mutante é cerca de 75% menor do que a apresentada a partir da interação com o AP-1 consenso.

Apesar dos resultados mostrarem uma ligação menos intensa de c-Jun com o elemento similar a AP-1 contido no promotor do gene de GR humano, restava ainda determinar a afinidade desta ligação. Para tanto foram realizados ensaios de competição usando-se extrato nuclear de células NIH3T3 (figura 17).

Nesta abordagem, concentrações fixas do oligonucleotídeo marcado, contendo a seqüência AP-1 consenso mais o extrato nuclear de células NIH3T3, foram incubadas com concentrações crescentes dos oligonucleotídeos radioinertes. Após a incubação as misturas foram separadas em um gel de poliacrilamida como descrito anteriormente. Os valores quantificados por densitometria das bandas impressionadas no filme de raio X estão relacionadas na forma de gráfico na figura 18. Este gráfico representa de forma clara a capacidade dos oligonucleotídeos radioinertes de deslocarem a ligação do AP-1 consenso com c-Jun.

A análise dos dados relacionados no gráfico mostra que, a adição de uma concentração 2,5 vezes maior de AP-1 consenso radioinerte inibe quase que totalmente a ligação de c-Jun a AP-1 consenso marcado, enquanto que a competição com a mesma concentração da seqüência AP-1 presente no promotor de GR humano leva à uma inibição de apenas 6% desta ligação. Mesmo após a adição de uma concentração 20 vezes maior de AP-1 GRprom, a ligação de c-Jun com AP-1 consenso não foi substancialmente deslocada (comparar também linhas 7 e 17 da figura 17). Portanto, a seqüência similar a AP-1 presente no promotor de GR não é capaz de deslocar eficientemente o complexo AP-1

consenso - c-Jun (comparar também linhas 13 a 17 da figura 17). Um perfil semelhante foi observado para o oligonucleotídeo de AP-1 mutante (comparar também linhas 12 a 17 da figura 17). No caso deste último, o deslocamento é ainda menor, mesmo após a adição de 20 vezes mais oligonucleotídeos radioinertes.

Os experimentos de mobilidade eletroforética sugerem que c-Jun não é capaz de ligar o elemento AP-1 contido no promotor de GR com a mesma afinidade com que faz a AP-1 consenso.

phGRpromCAT (μg)	20	20	20	20	20	20	20	20
pRSV c-jun (μg)	0	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10	20
Linha	1	2	3	4	5	6	7	8

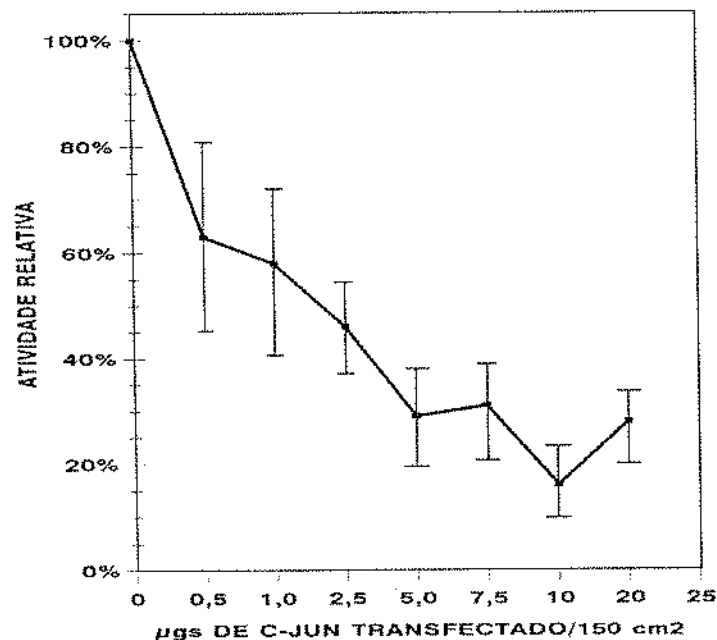
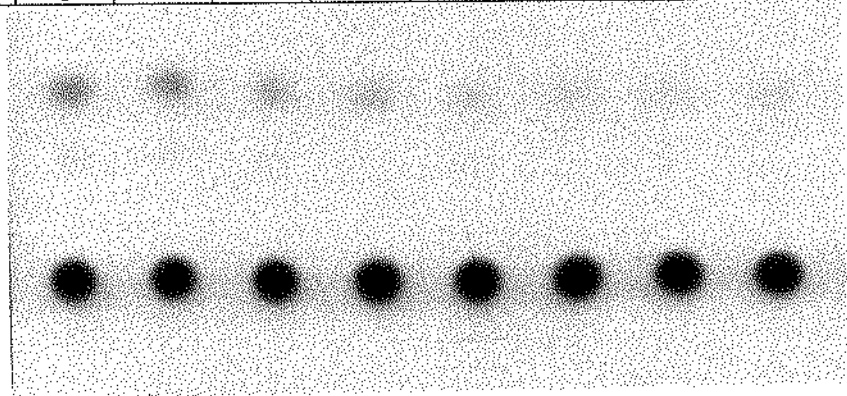


FIGURA 1

Ensaio de CAT

Garrafas de 150cm² de células NIH3T3 foram transfectadas com 20 μg de phGRprom CAT (linhas 1 a 8) e co-transfectadas com pRSVc-*jun* (linhas 2-8) em concentrações crescentes de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 μg . Após 48 horas da transfecção a atividade de CAT foi avaliada nos extratos celulares pelo uso de [¹⁴C] cloranfenicol. Os produtos acetilados foram separados por cromatografia em camada delgada e o autorradiograma foi obtido após a exposição de um filme de raio X à placa. Os sinais referentes aos produtos acetilados foram excisados, contados em um cintilador β e daí obtidos os valores relativos à célula NIH3T3 transfectada apenas com phGRprom CAT. O gráfico representa a média dos valores relativos obtidos a partir de 4 ensaios realizados e normalizados pela atividade de β -galactosidase.

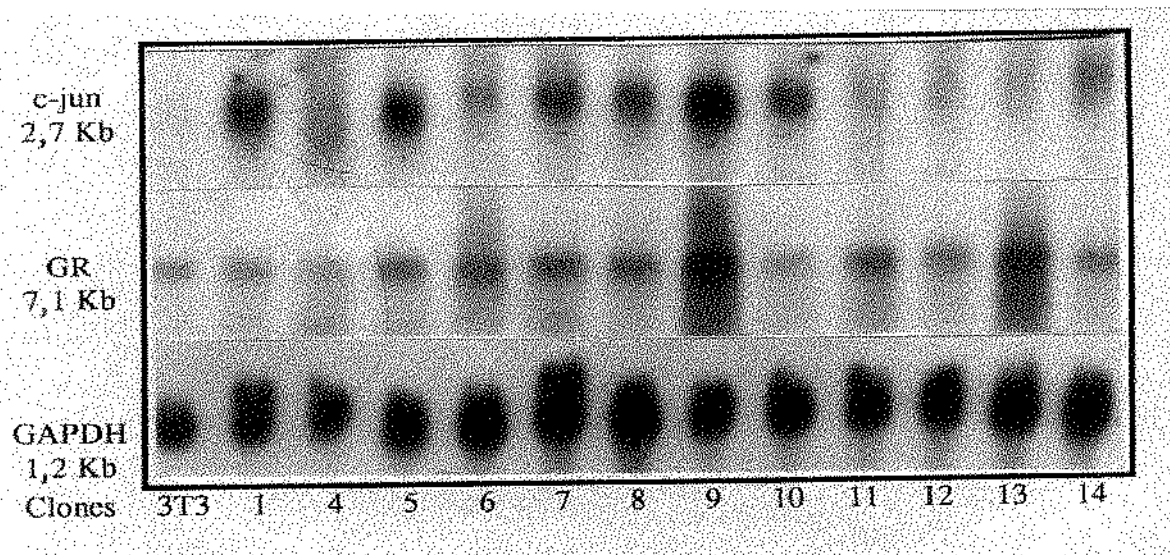


FIGURA 2
Expressão dos RNAm de *c-jun*, GR e GAPDH em células NIH3T3
c-jun, clones 1 e 4 a 14

A figura mostra uma composição dos autoradiogramas obtidos a partir da exposição de filmes de raio-X à membrana, após a hibridização com cada uma das sondas separadamente. O RNA total das células foi extraído e purificado em colchão de césio, 20 µg de cada RNA foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados sequencialmente com sondas de DNA complementares aos RNAm de *c-jun* (2,7 Kb), GR (7,1 Kb) e GAPDH (1,2 Kb) marcadas com [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. A linha 1 mostra o controle para os respectivos RNAm de células NIH3T3 parentais (3T3) crescidas em 10% de FBS.

Tabela 1- Análise densitométrica referente a figura 2

clone	RNAm			Jun/ GAPDH	GR/ GAPDH	Rel Jun	Rel GR
	Jun	GR	GAPDH				
10%	0,123	0,354	1,754	0,070	0,202	1,00	1,00
1	1,608	0,292	2,481	0,648	0,118	9,26	0,58
4	0,450	0,190	2,022	0,223	0,094	3,19	0,47
5	1,536	0,475	3,105	0,495	0,153	7,07	0,76
6	0,559	0,444	3,022	0,185	0,147	2,64	0,73
7	0,973	0,440	3,855	0,252	0,114	3,60	0,56
8	1,143	0,429	3,297	0,347	0,130	4,96	0,64
9	2,046	0,501	2,474	0,827	0,203	11,81	1,00
10	1,110	0,168	2,778	0,400	0,060	5,71	0,30
11	0,222	0,419	2,747	0,081	0,153	1,16	0,76
12	0,214	0,375	2,779	0,077	0,135	1,10	0,67
13	0,275	0,413	3,244	0,085	0,127	1,21	0,63
14	0,699	0,353	3,287	0,213	0,107	3,04	0,53

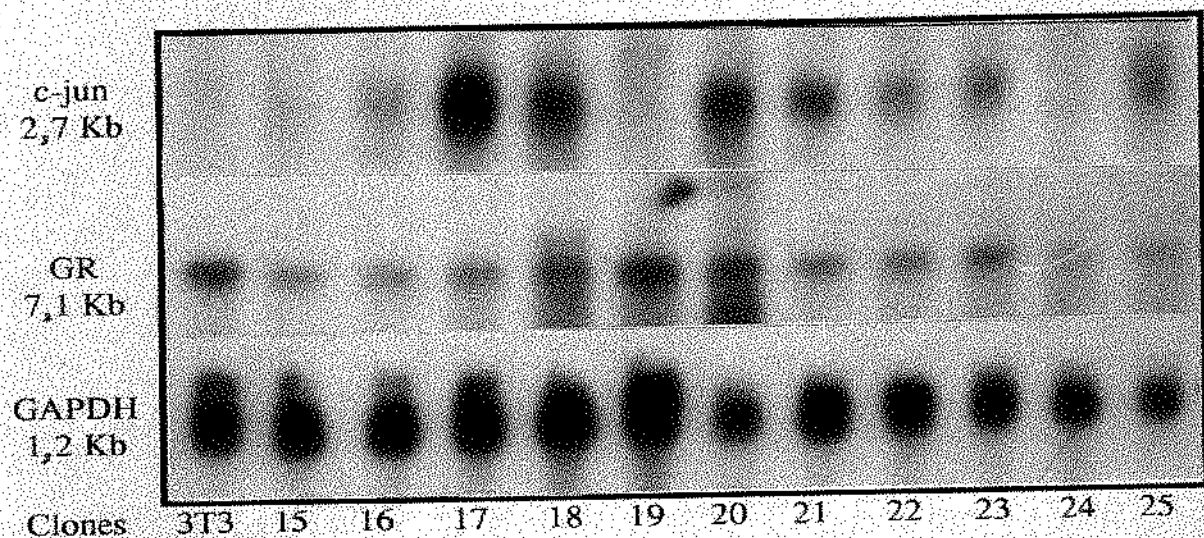


FIGURA 3
Expressão dos RNAm de *c-jun*, GR e GAPDH em células NIH3T3
c-jun, clones 15 a 25

A figura mostra uma composição dos autoradiogramas obtidos a partir da exposição de filmes de raio-X à membrana, após a hibridização com cada uma das sondas separadamente. O RNA total das células foi extraído e purificado em colchão de césio, 20 µg de cada RNA foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados sequencialmente com sondas de DNA complementares aos RNAm de *c-jun* (2,7 Kb), GR (7,1 Kb) e GAPDH (1,2 Kb) marcadas com [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. A linha 1 mostra o controle para os respectivos RNAm de células NIH3T3 parentais (3T3) crescidas em 10% de FBS.

Tabela 2 - Análise densitométrica referente à figura 3

Clone	RNAm			Jun/ GAPDH	GR/ GAPDH	Rel Jun	Rel GR
	Jun	GR	GAPDH				
10%	0,109	0,696	3,706	0,029	0,188	1,00	1,00
15	0,127	0,273	3,089	0,041	0,088	1,41	0,47
16	0,350	0,245	3,625	0,097	0,068	3,34	0,36
17	2,583	0,270	3,813	0,677	0,071	23,34	0,38
18	1,521	0,397	4,372	0,348	0,091	12,00	0,48
19	0,295	0,641	4,663	0,063	0,137	2,17	0,73
20	1,249	0,275	1,766	0,707	0,156	24,38	0,83
21	1,154	0,275	2,990	0,386	0,092	13,31	0,49
22	0,610	0,222	2,796	0,218	0,079	7,52	0,42
23	0,749	0,249	2,447	0,306	0,102	10,55	0,54
24	0,173	0,118	2,201	0,079	0,054	2,72	0,29
25	1,075	0,105	1,441	0,746	0,073	25,72	0,39

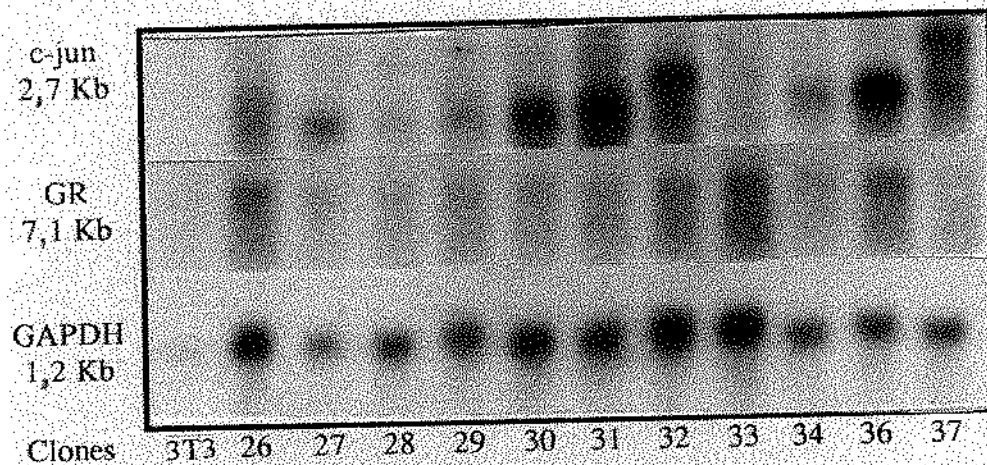


FIGURA 4
Expressão dos RNAm de *c-jun*, GR e GAPDH em células NIH3T3
c-jun, clones 26 a 34, 36 e 37

A figura mostra uma composição dos autoradiogramas obtidos a partir da exposição de filmes de raio-X à membrana, após a hibridização com cada uma das sondas separadamente. O RNA total das células foi extraído e purificado em colchão de cério, 20 µg de cada RNA foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados sequencialmente com sondas de DNA complementares aos RNAm de *c-jun* (2,7 Kb), GR (7,1 Kb) e GAPDH (1,2 Kb) marcadas com [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. A linha 1 mostra o controle para os respectivos RNAm de células NIH3T3 parentais (3T3) crescidas em 10% de FBS.

Tabela 3 - Análise densitométrica referente a figura 4

Clone	RNAm			Jun/ GAPDH	GR/ GAPDH	Rel Jun	Rel GR
	Jun	GR	GAPDH				
10%	0,088	0,112	0,178	0,494	0,629	1,00	1,00
26	0,629	0,407	0,768	0,819	0,530	1,66	0,84
27	0,590	0,144	0,349	1,691	0,413	3,42	0,66
28	0,333	0,137	0,586	0,568	0,234	1,15	0,37
29	0,478	0,182	0,572	0,836	0,318	1,69	0,51
30	1,196	0,196	0,769	1,555	0,255	3,15	0,41
31	1,618	0,193	0,652	2,482	0,296	5,02	0,47
32	1,186	0,497	1,300	0,912	0,382	1,85	0,61
33	0,426	0,372	0,934	0,456	0,398	0,92	0,63
34	0,680	0,153	0,533	1,276	0,287	2,58	0,46
36	1,978	0,376	0,563	3,513	0,668	7,11	1,06
37	1,867	0,112	0,510	3,661	0,220	7,41	0,35

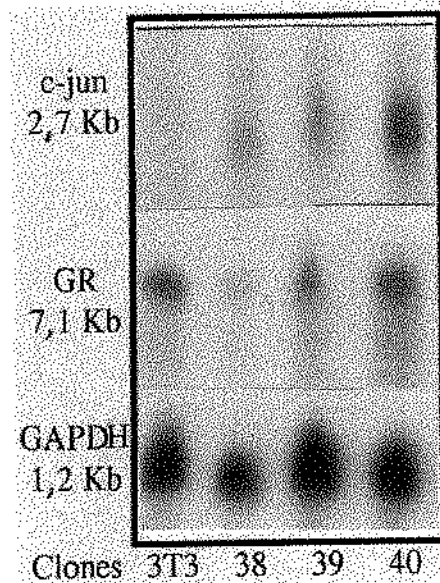


FIGURA 5
Expressão dos RNAm de *c-jun*, GR e GAPDH em células NIH3T3
c-jun, clones 38 a 40

A figura mostra uma composição dos autoradiogramas obtidos a partir da exposição de filmes de raio-X à membrana, após a hibridização com cada uma das sondas separadamente. O RNA total das células foi extraído e purificado em colchão de cério, 20 µg de cada RNA foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados sequencialmente com sondas de DNA complementares aos RNAm de *c-jun* (2,7 Kb), GR (7,1 Kb) e GAPDH (1,2 Kb) marcadas com [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP. A linha 1 mostra o controle para o respectivo RNAm de células NIH3T3 parentais (3T3) crescidas em 10% de FBS.

Tabela 4- Análise densitométrica referente à figura 5

Clone	RNAm					Rel Jun	Rel GR
	Jun	GR	GAPDH	Jun/ GAPDH	GR/ GAPDH		
10%	0,033	0,371	1,491	0,022	0,249	1,00	1,00
38	0,213	0,096	0,934	0,228	0,103	10,36	0,41
39	0,348	0,176	1,655	0,210	0,106	9,55	0,43
40	0,736	0,366	1,466	0,502	0,250	22,82	1,00

Análise da expressão dos RNAm de GR e c-jun dos clones NIH3T3 c-jun

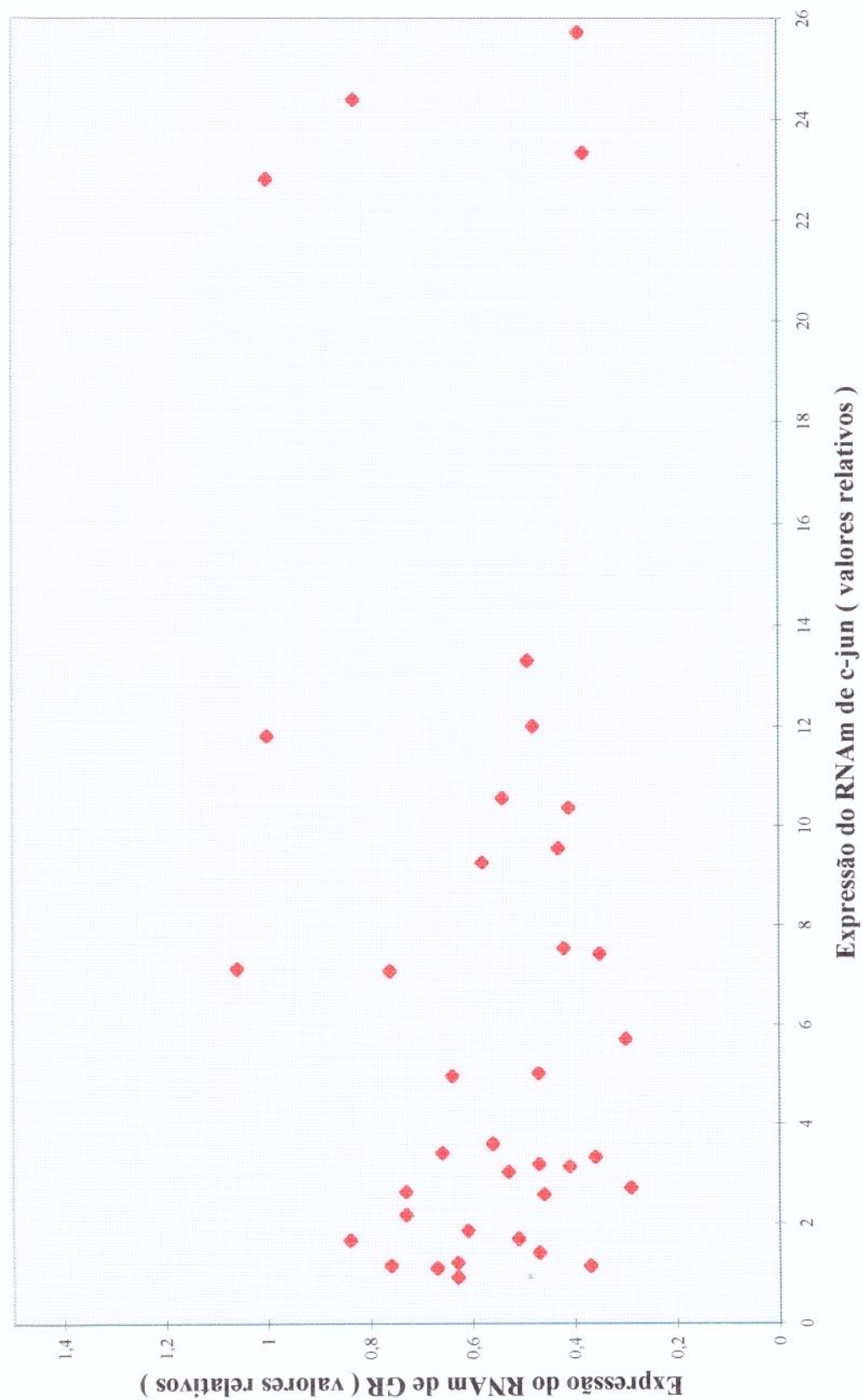


TABELA 5-Dosagem do receptor de glicocorticóide nos clones gerados

CLONE	fmoles/mg proteína	Relativo
14	24,3	0,09
26	66,3	0,23
20	73,5	0,26
4	102,1	0,36
25	105,4	0,37
6	112,7	0,40
13	123,8	0,43
12	141,5	0,50
22	170,8	0,60
11	175,5	0,62
18	175,5	0,62
10	183,9	0,65
9	192,3	0,68
30	207,8	0,73
17	213,9	0,75
16	224,6	0,79
40	247,8	0,87
8	248,4	0,87
34	264,9	0,93
33	266,1	0,93
29	267,8	0,94
28	271,6	0,95
7	271,9	0,96
27	274,2	0,96
3T3	284,6	1,00
23	298,3	1,05
31	307,6	1,08
32	308,9	1,09
1	315,7	1,11
21	327,0	1,15
38	335,0	1,18
37	339,5	1,19
19	339,7	1,19
24	340,4	1,20
15	348,4	1,22
36	374,5	1,32
5	419,6	1,47
39	439,0	1,54

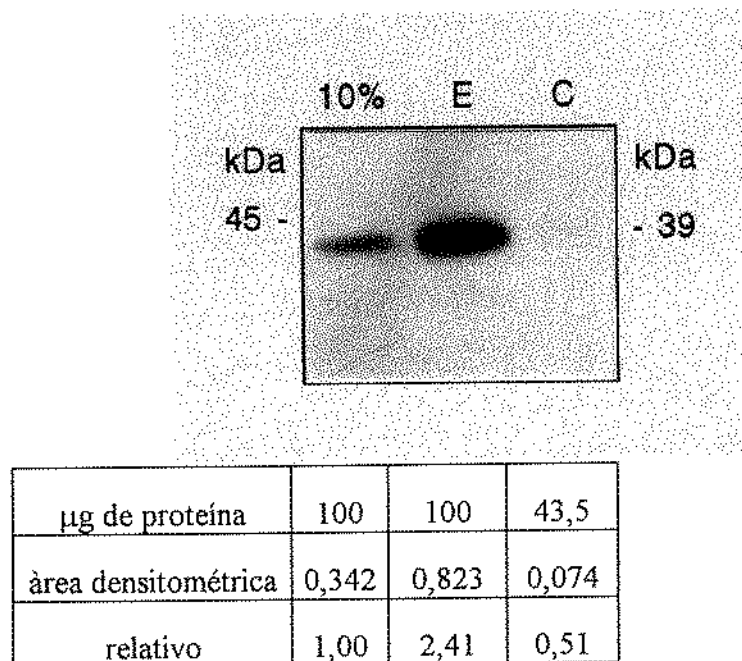


FIGURA 7

Quantificação da proteína c-Jun de células NIH3T3 em diferentes condições de crescimento

Extratos contendo 100 ou 43,5µg de proteína total de células NIH3T3 crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS (10%) ou carenciadas com 1% de FBS por 48 horas (C) e reestimuladas com 20 % de FBS por duas horas após a carência (E), foram separados em gel com 10% de poliacrilamida, desnaturante, e transferidos para a membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com anticorpo anti c-Jun (1:200) e posteriormente com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (1:1000) e revelada segundo o Kit de quimioluminescência ECL (Amersham). Na margem direita está representado o peso molecular de 39 kDa da proteína c-Jun e na margem esquerda o padrão de peso molecular de 45 kDa separado conjuntamente no gel.

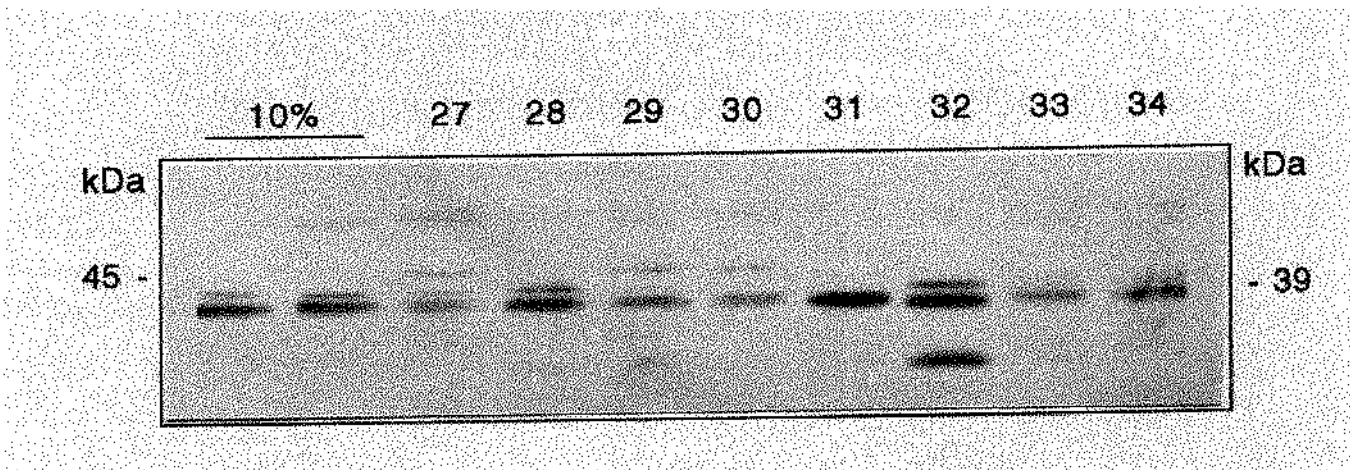


FIGURA 8

Quantificação da proteína c-Jun nos clones NIH3T3 *c-jun*

Extratos contendo 100 µg de proteína total de células NIH3T3 (linhas indicadas 10%) e NIH3T3 *c-jun* (os números acima de cada linha correspondem aos números dos clones) crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS, foram separados em gel com 10% de poliacrilamida, desnaturante, e transferidos para a membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com anticorpo anti c-Jun (1:200) e posteriormente com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (1:1000) e revelada segundo o Kit de quimioluminescência ECL (Amersham). Na margem direita está representado o peso molecular de 39 kDa da proteína c-Jun e na margem esquerda o padrão de peso molecular de 45 kDa separado conjuntamente no gel.

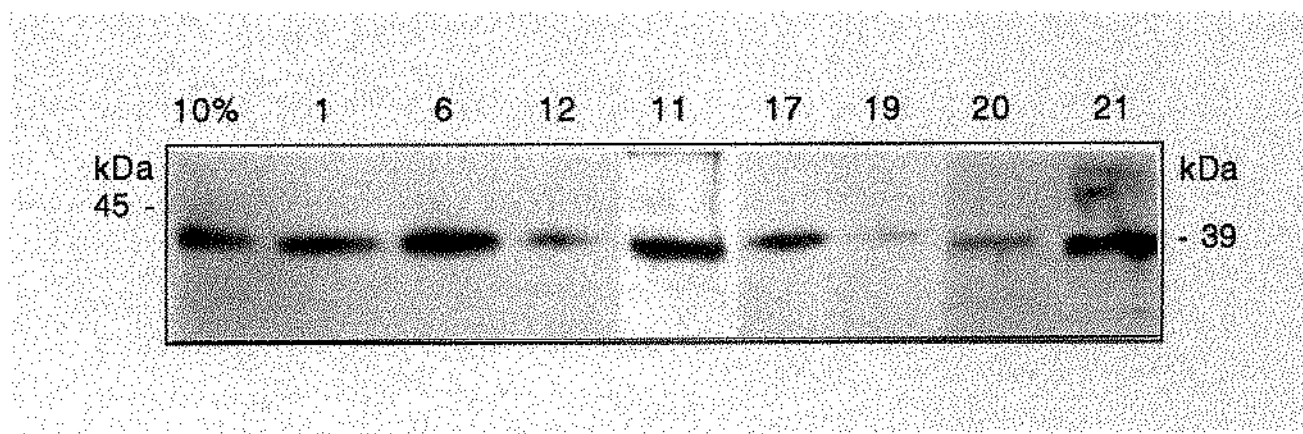


FIGURA 9

Quantificação da proteína c-Jun nos clones NIH3T3 *c-jun*

Extratos contendo 100 µg de proteína total de células NIH3T3(linha indicada 10%) e NIH3T3 *c-jun* (os números acima de cada linha correspondem aos números dos clones) crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS, foram separados em gel com 10% de poliacrilamida, desnaturante, e transferidos para a membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com anticorpo anti c-Jun (1:200) e posteriormente com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (1:1000) e revelada segundo o Kit de quimioluminescência ECL (Amersham). Na margem direita está representado o peso molecular de 39 kDa da proteína c-Jun e na margem esquerda o padrão de peso molecular de 45 kDa separado conjuntamente no gel.

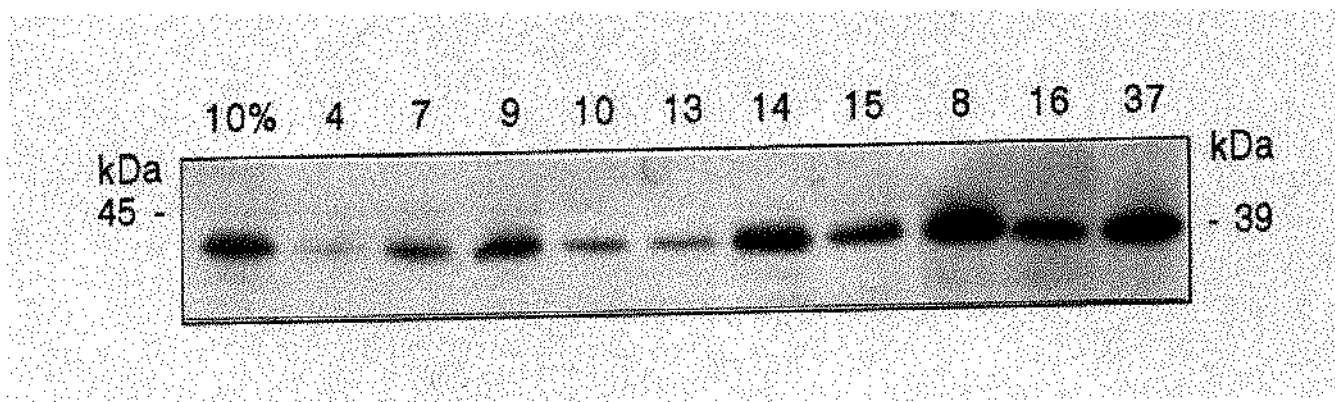


FIGURA 10

Quantificação da proteína c-Jun nos clones NIH3T3 *c-jun*

Extratos contendo 100 µg de proteína total de células NIH3T3 (linha indicada 10%) e NIH3T3 *c-jun* (os números acima de cada linha correspondem aos números dos clones) crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS, foram separados em gel com 10% de poliacrilamida, desnaturante, e transferidos para a membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com anticorpo anti c-Jun (1:200) e posteriormente com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (1:1000) e revelada segundo o Kit de quimioluminescência ECL (Amersham). Na margem direita está representado o peso molecular de 39 kDa da proteína c-Jun e na margem esquerda o padrão de peso molecular de 45 kDa separado conjuntamente no gel.

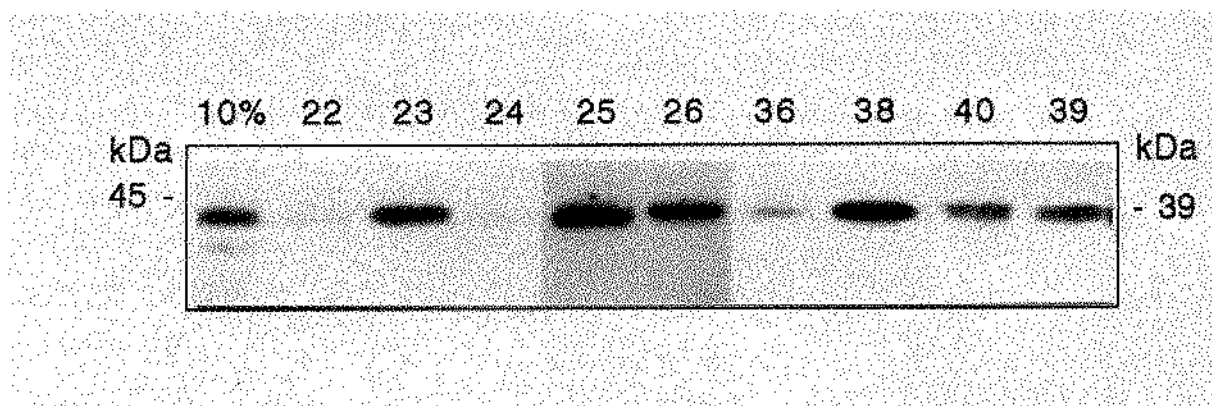


FIGURA 11

Quantificação da proteína c-Jun nos clones NIH3T3 *c-jun*

Extratos contendo 100 µg de proteína total de células NIH3T3(linha indicada 10%) e NIH3T3 *c-jun* (os números acima de cada linha correspondem aos números dos clones) crescidas em DMEM acrescido de 10% de FBS, foram separados em gel com 10% de poliacrilamida, desnaturante, e transferidos para a membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com anticorpo anti c-Jun (1:200) e posteriormente com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (1:1000) e revelada segundo o Kit de quimioluminescência ECL (Amersham). Na margem direita está representado o peso molecular de 39 kDa da proteína c-Jun e na margem esquerda o padrão de peso molecular de 45 kDa separado conjuntamente no gel.

TABELA 6- Resumo geral dos valores relativos dos RNAm e proteínas c-Jun e GR

CLONES	RNAm GR	RNAm Jun	Proteína GR	Proteína Jun
NIH3T3	1,00	1,00	1,00	1,00
1	0,58	9,26	1,11	1,35
4	0,47	3,19	0,36	0,40
5	0,76	7,07	1,47	---
6	0,73	2,64	0,40	2,10
7	0,56	3,60	0,96	1,01
8	0,64	4,96	0,87	2,86
9	1,00	11,81	0,68	1,65
10	0,30	5,71	0,65	0,86
11	0,76	1,16	0,62	2,16
12	0,67	1,10	0,50	0,71
13	0,63	1,21	0,43	0,55
14	0,53	3,04	0,09	2,32
15	0,47	1,41	1,22	1,55
16	0,36	3,34	0,79	1,12
17	0,38	23,34	0,75	1,06
18	0,48	12,00	0,62	1,32
19	0,73	2,17	1,19	0,31
20	0,83	24,38	0,26	0,43
21	0,49	13,31	1,15	1,60
22	0,42	7,52	0,60	0,25
23	0,54	10,55	1,04	1,47
24	0,29	2,72	1,20	0,28
25	0,39	25,72	0,37	3,99
26	0,84	1,66	0,23	2,46
27	0,66	3,42	0,96	0,45
28	0,37	1,15	0,95	0,97
29	0,51	1,69	0,94	0,57
30	0,41	3,15	0,73	0,44
31	0,47	5,02	1,06	1,41
32	0,61	1,85	1,09	1,88
33	0,63	0,92	0,93	0,50
34	0,46	2,58	0,93	0,79
36	1,06	7,11	1,32	0,40
37	0,35	7,41	1,19	2,59
38	0,41	10,36	1,18	5,70
39	0,43	9,55	1,54	0,87
40	1,00	22,82	0,87	0,74

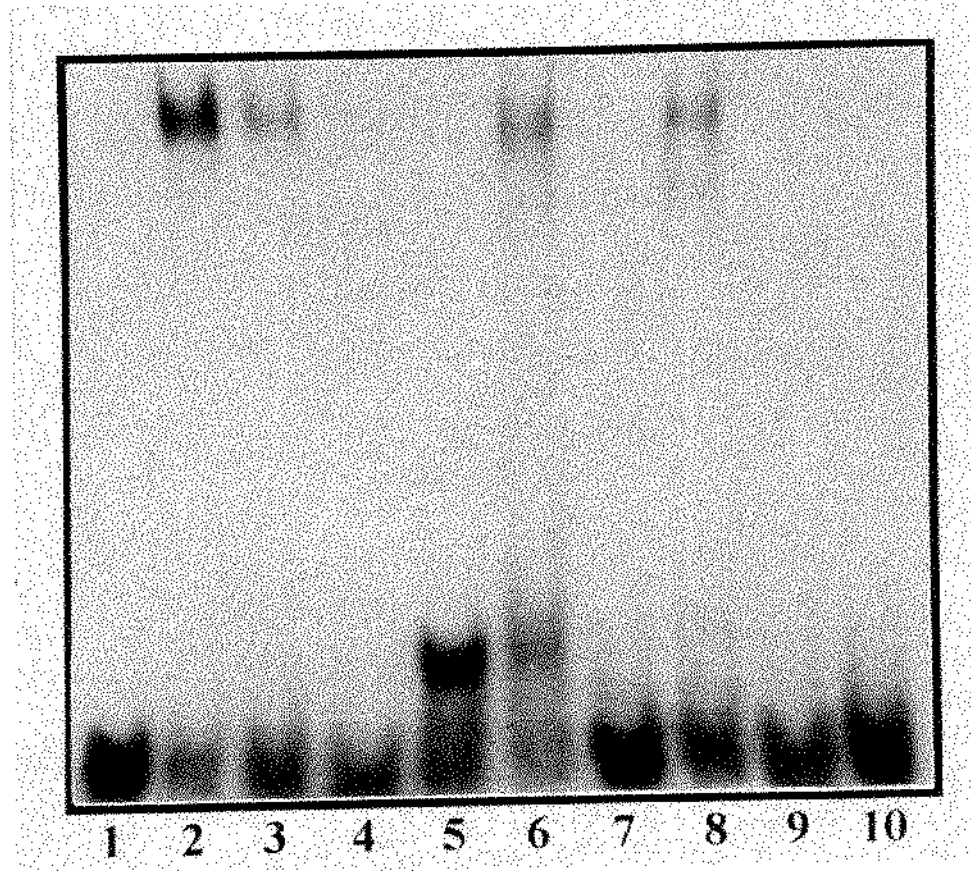


FIGURA 12

Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética com extratos nucleares de células E 8.2

Padronização do ensaio realizado com sequências de oligonucleotídeos dupla fita contendo o sítio AP-1 consenso [5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'] (1-4), AP-1 mutante [5'-CGC TTG ATG ACT TGG CCG GAA-3'] (5,6) e a região entre -905 a -885 [5'- TCG AAG TGA CAC ACT TCA CGC-3'] do promotor de GR (7-10). Os oligonucleotídeos marcados foram incubados na ausência de extratos nucleares (linhas 1, 5 e 7), 5µg de extrato nuclear de células E8.2 (2, 6 e 8), 5 µg de extrato nuclear mais 100 vezes o respectivo oligonucleotídeo não radioativo (3, 10) e 5 µg de extrato nuclear imunodepletado com anticorpo anti c-Jun (4, 9).

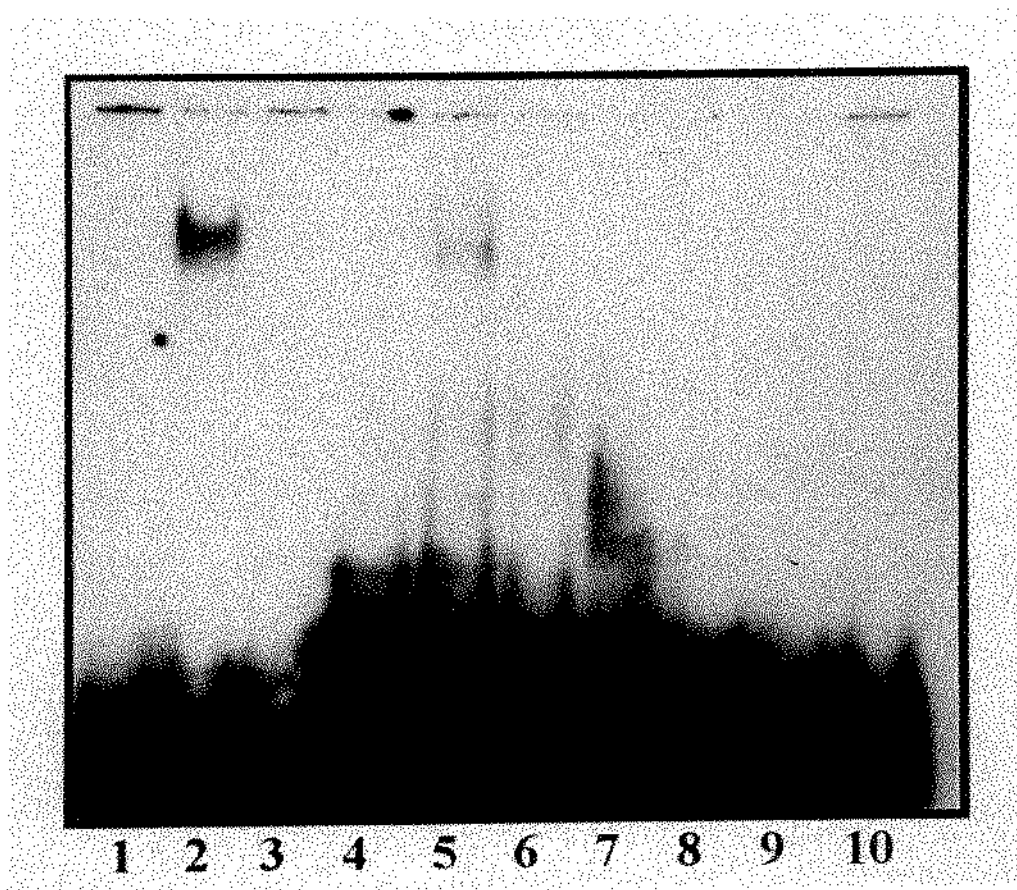


FIGURA 13

Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética com extratos nucleares de células NIH3T3

Ensaio realizado com sequências de oligonucleotídeos dupla fita contendo o sítio AP-1 consenso [5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'] (1-3), AP-1 mutante [5'-CGC TTG ATG ACT TGG CCG GAA-3'] (4-6) e a região entre -905 a -885 [5'- TCG AAG TGA CAC ACT TCA CGC-3'] do promotor de GR (7-10). Os oligonucleotídeos marcados foram incubados na ausência de extratos nucleares (linhas 1, 4 e 7), na presença de 5µg de extrato nuclear de células NIH3T3 (2, 5 e 8), 5 µg de extrato nuclear imunodepletado com anticorpo anti c-Jun (3, 6 e 9) e 5µg de extrato nuclear mais 100 vezes o respectivo oligonucleotídeo radioinerte (linha 10).

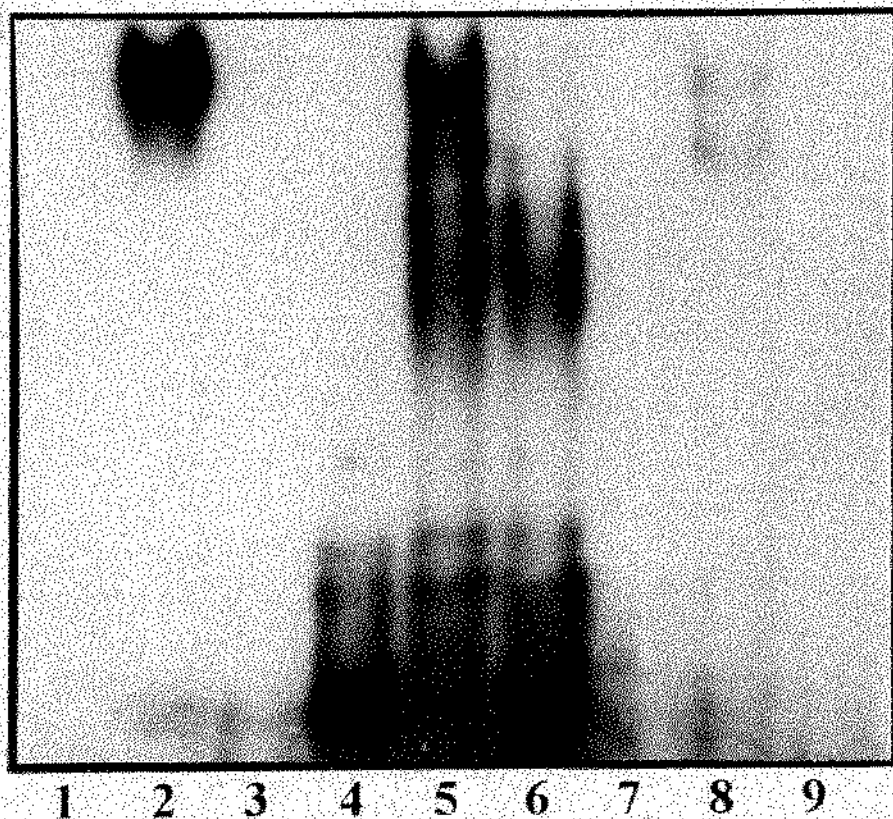


FIGURA 14

Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética com extratos nucleares de células NIH3T3 *c-jun* 14

Ensaio realizado com sequências de oligonucleotídeos dupla fita contendo o sítio AP-1 consenso [5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'] (1-3), AP-1 mutante [5'-CGC TTG ATG ACT TGG CCG GAA-3'] (4-6) e a região entre -905 a -885 [5'- TCG AAG TGA CAC ACT TCA CGC-3'] do promotor de GR (7-9). Os oligonucleotídeos marcados foram incubados na ausência de extratos nucleares (linhas 1, 4 e 7), na presença de 5µg de extrato nuclear de células NIH3T3 *c-jun* 14 (2, 5 e 8) e 5 µg de extrato nuclear imunodepletado com anticorpo anti c-Jun (3, 6 e 9).

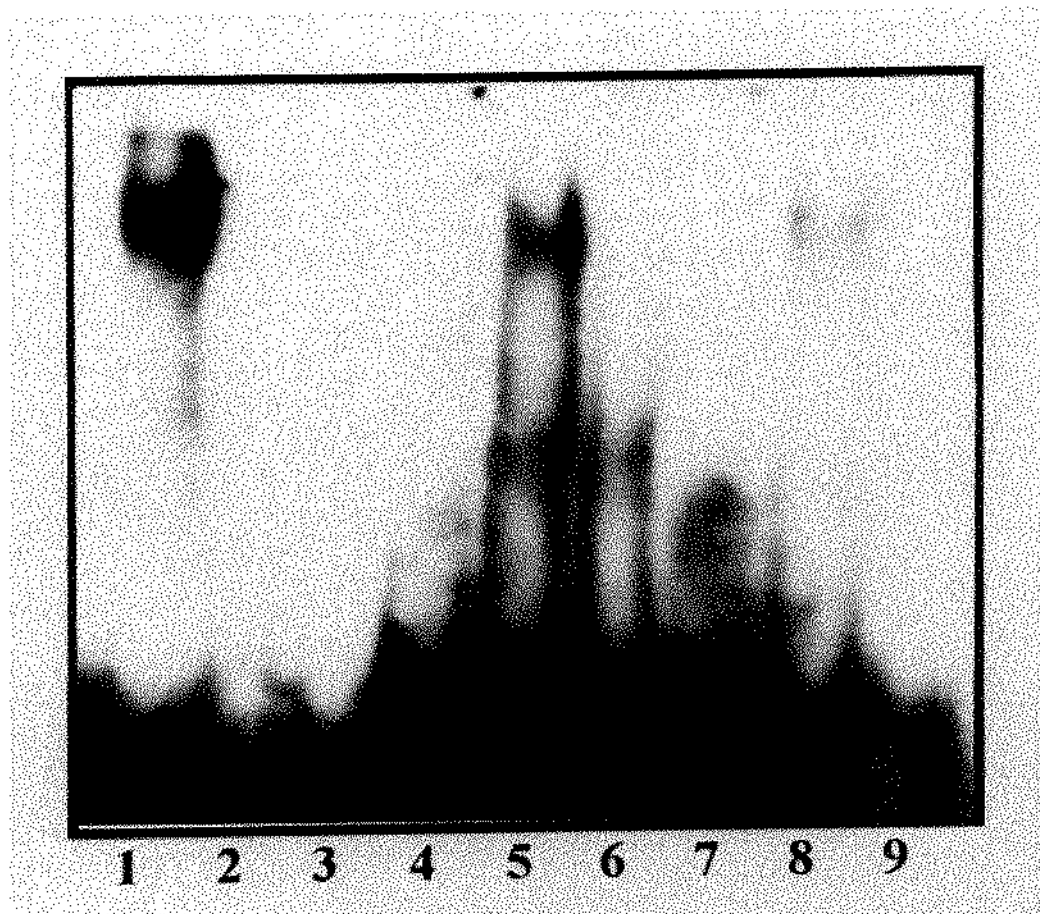


FIGURA 15

Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética com extratos

nucleares de células NIH3T3 *c-jun* 26

Ensaio realizado com sequências de oligonucleotídeos dupla fita contendo o sítio AP-1 consenso [5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'] (1-3), AP-1 mutante [5'-CGC TTG ATG ACT TGG CCG GAA-3'] (4-6) e a região entre -905 a -885 [5'- TCG AAG TGA CAC ACT TCA CGC-3'] do promotor de GR (7-9). Os oligonucleotídeos marcados foram incubados na ausência de extratos nucleares (linhas 3, 4 e 7), na presença de 5µg de extrato nuclear de células NIH3T3 *c-jun* 26 (1, 5 e 8) e 5 µg de extrato nuclear imunodepletado com anticorpo anti c-Jun (2, 6 e 9).

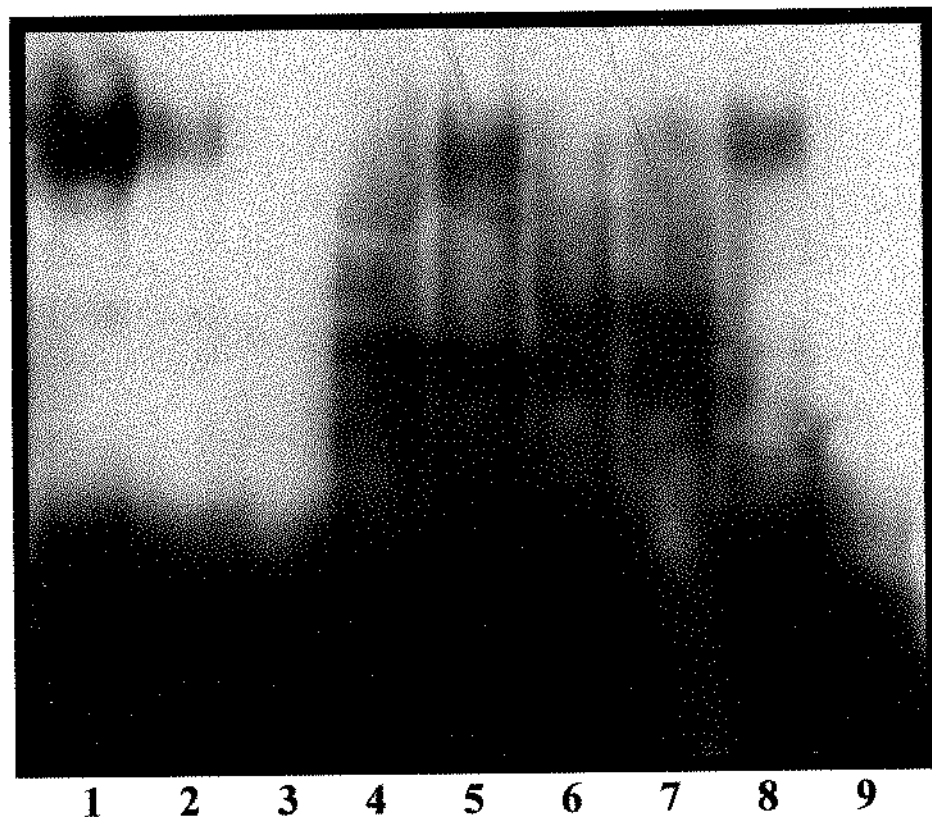


FIGURA 16

Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética com extratos nucleares de células NIH3T3 *c-jun* 36

Ensaio realizado com sequências de oligonucleotídeos dupla fita contendo o sítio AP-1 consenso [5'-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'] (1-3), AP-1 mutante [5'-CGC TTG ATG ACT TGG CCG GAA-3'] (4-6) e a região entre -905 a -885 [5'- TCG AAG TGA CAC ACT TCA CGC-3'] do promotor de GR (7-9). Os oligonucleotídeos marcados foram incubados na ausência de extratos nucleares (linhas 3, 4 e 7), na presença de 5µg de extrato nuclear de células NIH3T3 *c-jun* 36 (1, 5 e 8) e 5 µg de extrato nuclear imunodepletado com anticorpo anti c-Jun (2, 6 e 9).

Tabela 7 - Valores relativos da ligação de c-Jun a AP-1 consenso (AP-1c), AP-1 mutante (AP-1m) e AP-1 presente no promotor de GR (AP-1 GR prom)

Células	AP-1c	AP-1 m	AP-1 GRprom
NIH3T3	1,00	0,18	ND
E 8.2	1,00	0,24	0,28
NIH3T3 <i>c-jun</i> 14	1,00	0,28	0,31
NIH3T3 <i>c-jun</i> 26	1,00	0,26	0,10
NIH3T3 <i>c-jun</i> 36	1,00	0,25	0,29

ND = não detectado

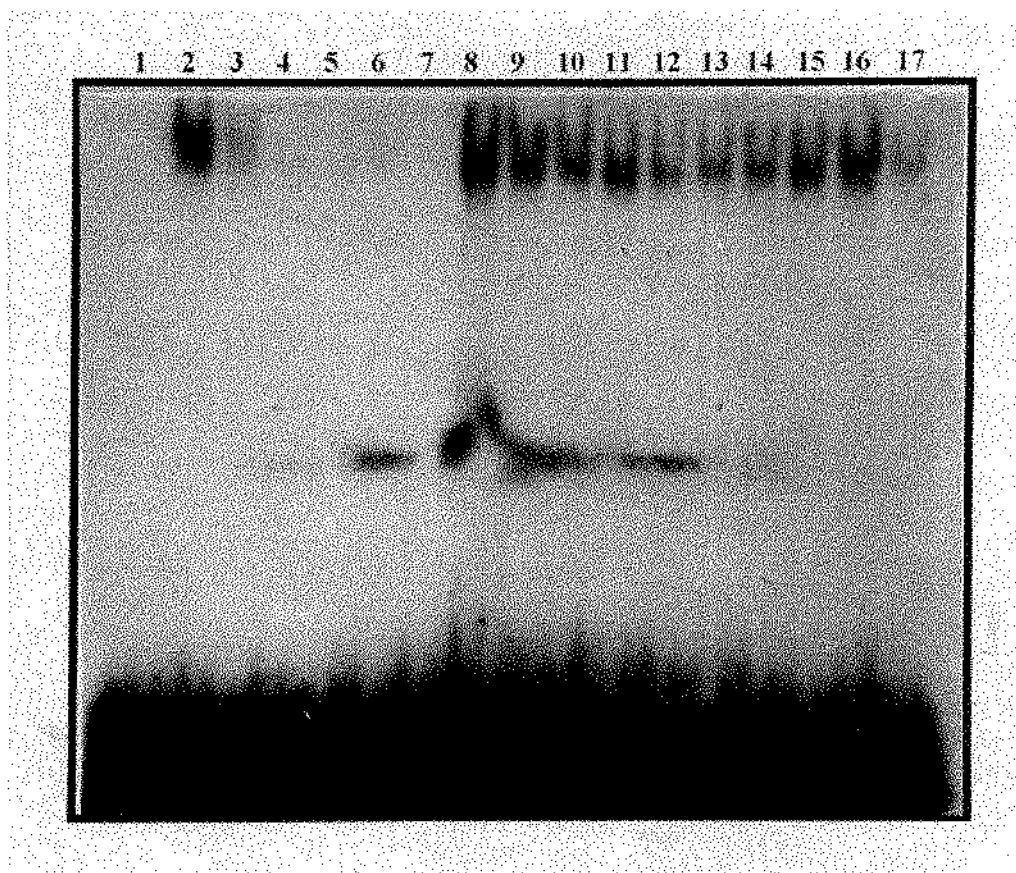


FIGURA 17

Ensaio de competição da ligação de c-Jun a [32 P] AP-1 consenso por

AP-1 consenso, AP-1 mutante e AP-1 GRprom radioinertes.

Ensaio realizado após a incubação de [32 P] AP-1 consenso na ausência (linha 1) e presença (linhas 2-17) de 5 μ g de extrato nuclear de células NIH3T3. Concentrações 2,5; 5,0; 7,5; 10; e 20 vezes maior de AP-1 consenso (3-7), AP-1 mutante (linhas 8-12) e a região de -905 a -885 do promotor de GR (linhas 16, 15, 14, 13 e 17 respectivamente) foram adicionadas ao experimento.

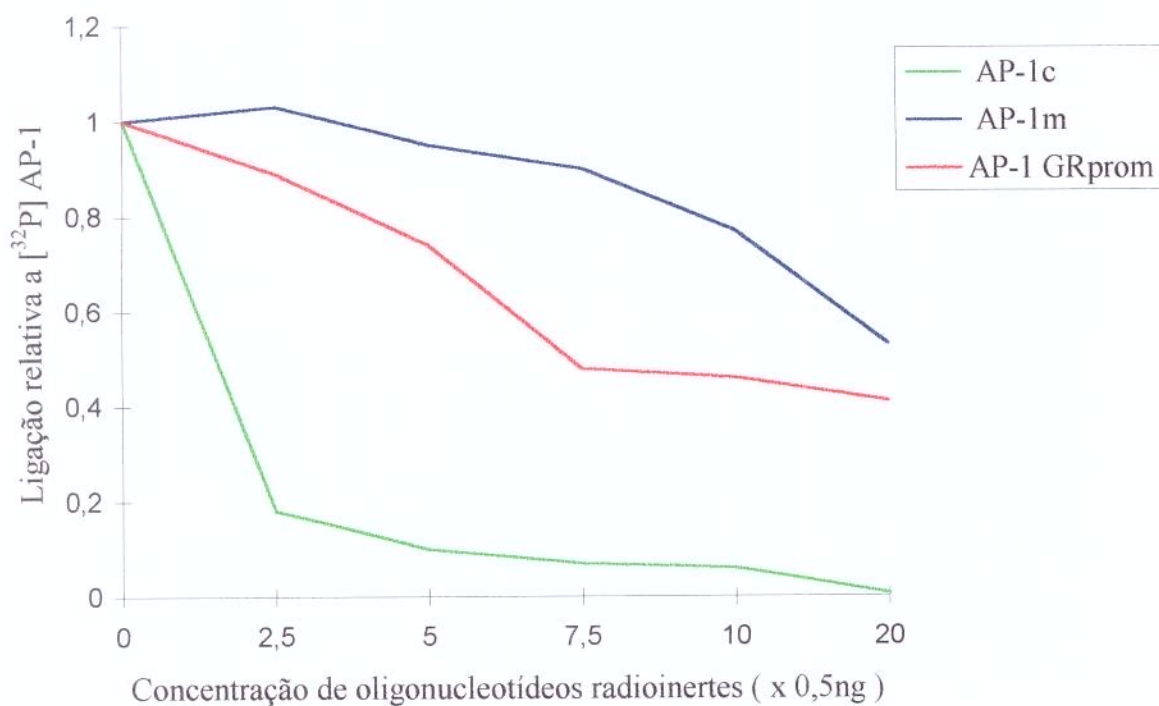


FIGURA 18

Competição da ligação de c-Jun a AP-1 consenso

O gráfico mostra a média dos valores obtidos a partir de dois ensaios de competição realizados com extratos nucleares de células NIH3T3 na presença de 0,5ng de $[^{32}\text{P}]$ AP-1. As reações foram competidas com concentrações crescentes de oligonucleotídeos radioinertes equivalentes a 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 vezes a concentração do radioativo. Um destes ensaios está representado na figura 17.

DISCUSSÃO

Quando realizamos experimentos de co-transfecção transitória em células NIH3T3 com phGRpromCAT e pRSVc-*jun* constatamos que o produto do proto-oncogene *c-jun* foi capaz de reprimir a atividade do promotor do gene do receptor de glicocorticóide (figura 1).

Martins e cols (1995) demonstraram a clara redução da concentração do receptor do hormônio glicocorticóide em células transformadas pelo oncogene *EJ-ras*. Neste trabalho, ainda, concluiu-se que esta regulação seria dada pela atuação indireta da proteína Ras na atividade transcricional do promotor do gene de GR.

Foi demonstrado recentemente que Ras pode ativar a cascata de quinases que envolve proteínas induzidas por estresse culminando com a fosforilação de c-Jun e ATF2 (Smeal e cols, 1991; Westwick e cols, 1994; Gupta e cols, 1995; Lin e cols, 1995). Esta família de quinases envolve a MAPK (“mitogen activating protein kinase”) que ativa JNK (“Jun N-terminal kinase”) resultando na fosforilação do fator de transcrição nuclear c-Jun (Lin e cols, 1995). Desta forma a fosforilação de Jun por JNK requer a cooperação de Ras e é importante para sua atividade transcricional e funções oncogênicas (Smeal e cols, 1991; Westwick e cols, 1994; Gupta e cols, 1995; Lin e cols, 1995).

Adler e cols (1995) demonstraram que *in vitro* p21^{ras}, a proteína codificada pelo oncogene *ras*, pode interagir e ativar tanto JNK como a própria proteína Jun. Os autores propõem que Ras serviria como âncora para diferentes proteínas quinases, já que está localizada na membrana (Barbacid, 1987), desencadeando diversos caminhos para a transdução de sinal.

A reunião destes experimentos preliminares e de inúmeros dados consistentes da literatura sustentam a hipótese inicialmente proposta pelo trabalho anterior (Martins e cols, 1995), ou seja, de que a atenuação da transcrição do gene de GR em células transformadas por Ras poderia ser mediada pelo aumento da atividade da proteína c-Jun. Além disso, esta atenuação estimula o conhecimento dos mecanismos envolvidos neste processo.

Ensaio de transfecção transitória com vetores “reporter”, neste caso contendo o gene CAT, são limitantes quando se pretende estudar um mecanismo complexo de regulação gênica. Portanto, foram estabelecidos clones de células NIH3T3 transfectadas com *c-jun* de forma que estes pudessem ser analisados quanto à expressão de GR. Este modelo permite avaliar o comportamento do promotor endógeno de GR, a regulação da transcrição e as alterações pós transcricionais da proteína receptora na presença de quantidades variáveis da proteína c-Jun.

Os resultados dos ensaios de “Northern blot” mostraram inicialmente uma grande variação da expressão do RNAm de *c-jun* entre os clones isolados.

Uma possível explicação seria que, na geração dos clones, foi transfectado um excesso de 10 vezes mais do plasmídeo contendo o gene de *c-jun*, em relação ao plasmídeo que confere resistência ao antibiótico. Esta abordagem serviu para aumentar a possibilidade do clone selecionado ter incorporado o plasmídeo codificador de c-Jun. Isto pode incorrer na possibilidade da célula transfectada ter recebido diferente número de cópias do plasmídeo contendo o gene de *c-jun* e por consequência os clones gerados apresentam entre si valores relativos

bem diferentes para o RNAm de *c-jun*. Além disso, apesar do gene de *c-jun* estar sob controle de um promotor constitutivo forte (SV-40) a inserção do DNA plasmidial em diferentes regiões do genoma pode levar à diferenças na atividade do promotor exógeno (Gorman e cols, 1982).

A análise dos dados mostrou que, como esperado, a grande maioria dos clones gerados possuíam aumento da expressão do RNAm de *c-jun* e diminuição da expressão do RNAm de GR, sugerindo um papel relevante de c-Jun na regulação do gene de GR. Entretanto, revelou-se ainda que não existia uma relação inversamente proporcional entre estes dois eventos. Esta observação é consistente com o fato de que a expressão do RNAm nem sempre corresponde às concentrações protéicas detectáveis. Variações decorrentes da estabilidade do RNAm e da proteína podem ocorrer. Em particular, segundo nossa proposta, a transcrição do gene de GR deve depender da presença da proteína c-Jun funcional.

Genes regulados ao longo do ciclo celular possuem uma relação de síntese e degradação bastante eficientes. Sabe-se que os RNAm de *c-fos* e *c-myc*, por exemplo, são degradados por RNase altamente específica minutos após sua síntese (Greenberg e cols, 1986).

A alteração da estabilidade do RNAm como um mecanismo de regulação gênica não é único para estes sistemas. Em células procarióticas, a expressão de muitos genes envolvidos com o crescimento celular é controlada por modulação seletiva da estabilidade dos RNAs mensageiros. Sabe-se também que os genes que codificam as histonas apresentam um padrão de regulação dependente do ciclo

celular. Sua expressão é controlada tanto por mudanças na taxa de degradação do RNAm quanto por alterações na transcrição gênica durante a fase S (revisado por Thompson e cols, 1986).

É interessante notar ainda que a atenuação na expressão do RNAm de GR nos clones gerados chega a no máximo 70%, o que pode indicar que a repressão mediada por c-Jun é saturável. Resultados semelhantes podem ser observados também para os ensaios de transfecção transitória (figura 1). Portanto, parece que esta repressão do RNAm de GR por c-Jun nunca chega a ser total.

A quantificação do RNAm de GR pode, como já foi discutido, não inferir proporcionalidade direta nas quantidades da proteína receptora ou ainda na resposta celular ao hormônio. Desta forma, foi realizada então a quantificação da proteína receptora do hormônio glicocorticóide para correlacionar suas concentrações com as de seu RNAm codificador e com o RNAm de *c-jun*.

Os dados obtidos mostram que aproximadamente metade dos clones apresentam proteína GR diminuída e que, à exceção do clone 12, todos estes clones apresentam RNAm de c-Jun aumentado. O clone 12 está incluído na faixa de erro que se admitiu ser de 10% para estes experimentos e portanto, foi considerado igual a célula normal. Entretanto, não se descarta totalmente a possibilidade deste representar um clone onde também há aumento do RNAm de c-Jun.

Estes resultados continuam a sugerir uma atuação de c-Jun sobre a expressão de GR. Relações inversamente proporcionais entre o RNAm de c-Jun e a proteína GR não foram encontrados. Aqui destaca-se novamente a importância da presença da proteína c-Jun para que o processo seja funcional.

Finalmente a relação entre a expressão do RNAm de GR e a quantidade de proteína receptora pode ser traçada. Os dados obtidos mostram que, entre eles, não há correlação diretamente proporcional, sugerindo que alterações pós-transcricionais podem também estar atuando no sistema.

O número de clones que possuem o RNAm de GR diminuído é bem maior do que os que possuem decréscimo da proteína GR. Portanto, poderíamos especular que c-Jun teria um papel mais importante na transcrição gênica do receptor. Mecanismos compensatórios poderiam atuar, por exemplo, na meia vida do RNAm de GR ou mesmo da proteína para que suas concentrações fossem mantidas e que a resposta ao hormônio não fosse alterada.

Variações na meia vida do RNAm de GR (Vedeckis e cols, 1989; Alksnis e cols, 1991) e da respectiva proteína (McIntyre e Samuels, 1985; Dong e cols, 1988; Hoeck e cols, 1989) já foram amplamente discutidos na literatura.

A partir disto, avaliar a concentração da proteína Jun tornou-se crucial para poder relacionar os dados obtidos com o possível aumento desta. Como descrito anteriormente, é a proteína c-Jun funcional que irá regular a transcrição gênica.

Apesar da grande maioria dos clones apresentar o RNAm de Jun aumentado, apenas uma parte deles apresenta aumento da proteína c-Jun, mostrando que as quantidades de RNAm de GR nem sempre refletem nas concentrações da proteína por ele codificada. Pode-se pensar, portanto, na existência de algum tipo de regulação pós-transcricional que a célula poderia utilizar para compensar a

expressão alta e constitutiva de uma proteína importante para o controle do ciclo celular.

A tentativa de obtenção de clones com alta expressão de c-Jun tem sido abordada com pouco sucesso por vários grupos (Rodrigo Bravo, comunicação pessoal). Especula-se que possa existir uma atividade celular específica que impede a célula de expressar este gene constitutivamente, em altas concentrações.

Um mecanismo muito interessante de regulação transcricional e pós transcricional tem sido descrito para alguns fatores de transcrição como *c-myc* (Nepveu e Marco, 1986; Resar e cols, 1993) e Oct-1 (Ohno e cols, 1994). Estes grupos mostraram que partes da fita complementar do DNA destes genes podia ser transcrita. Isto gerava pequenos RNAm antisense que bloqueavam a transcrição e a tradução dos RNAm sense, levando à uma diminuição da proteína por eles codificada. Entretanto, não se conhece se este tipo de mecanismo pode existir em relação ao fator transcricional c-Jun.

Uma outra explicação para a ausência de correlação entre as concentrações do RNAm de c-Jun e o aumento da respectiva proteína, ou mesmo o grande número de clones com decréscimo desta com relação à célula normal, seria a existência de um mecanismo de degradação de c-Jun.

Ciechanover e cols (1991) reportaram que existe um sistema de ubiquitina dependente de ATP que seria responsável pela degradação de proteínas como c-Myc e c-Fos, dentre outras. Um controle temporal parece envolver as proteínas c-Jun e c-Fos poli-ubiquitiniladas que são prontamente degradadas por proteínas multicatalíticas 26S dependentes de ATP (Hermida-Matsumoto, 1996). Nós aqui especulamos que um

mecanismo semelhante poderia estar ocorrendo de tal forma que a quantidade de proteína degradada fosse maior do que a sintetizada. Nos ensaios apresentados, a quantificação da proteína c-Jun mostrou uma boa reproducibilidade mesmo quando testados extratos obtidos em diferentes ocasiões.

A análise de nossos resultados mostra que, à exceção do clone 9, todos os clones com aumento da proteína c-Jun (17 de 36), ou seja, 47 % do total, apresentam redução do RNAm e da proteína GR (exceção feita aos clones 37 e 38), sugerindo fortemente a veracidade de nossa hipótese inicial, ou seja, de que a presença de proteína c-Jun funcional pode modificar a expressão do gene de GR e possivelmente a resposta celular ao hormônio por diminuir a concentração da proteína receptora.

Dados contraditórios entretanto são encontrados em 16 dos 36 clones (44 %) onde a presença de concentrações de c-Jun menores ou iguais a da célula parental levam à diminuição do RNAm de GR.

Vários motivos poderiam ser levantados para explicar estes dados pois um conjunto de fatores poderiam estar atuando na regulação de GR, tendo-se em mente de que a atividade da proteína c-Jun não está sendo medida, mas sim a concentração desta em cada clone.

A atividade transcricional de c-Jun é determinada pela fosforilação de resíduos de treonina e serina localizados na extremidade carboxila da molécula (Binetruy e cols, 1991; Smeal e cols, 1991), fosforilação esta promovida por JNK dentre outras (Marshall, 1995). Desta forma, as alterações pós-traducionais de c-Jun seriam cruciais para o desenrolar de sua atividade biológica.

Sabe-se que a regulação da expressão gênica é um processo complexo que envolve diferentes fatores transcricionais. Estes fatores podem se associar nas mais diversas combinações e a partir daí coordenar a ligação a elementos específicos do DNA (Ptashne, 1988). Portanto, podemos admitir que c-Jun deve ser importante para a expressão do gene de GR mas outros fatores transcricionais podem estar também coordenando este mecanismo.

A interação de c-Jun com fatores transcricionais de sua superfamília (Ryseck e Bravo, 1991) ou ainda com outros como CREB, GR, receptor de vitamina D, receptor de hormônio da tireóide e receptor de estrógeno pode levar à diferentes respostas na regulação da transcrição gênica (revisado por Pfahl, 1993). De forma geral, a resposta vai depender da relação entre a concentração de cada proteína e do promotor do gene que será regulado (revisado por Diamond e cols, 1990).

Um outro fato que deve ser apontado trata dos promotores de GR analisados neste trabalho. Em nossos ensaios iniciais de transfecção transitória medindo a atividade de c-Jun sobre a regulação da expressão de GR foi utilizada a seqüência do promotor do gene humano. Nos experimentos com os clones de NIH3T3 foi analisada a expressão do gene de GR endógeno, portanto, sob controle do promotor murino.

Strahle e cols (1992) demonstraram que a regulação do gene de GR de camundongo é mediada por três promotores distintos, um dos quais, mais próximo do sítio de início de transcrição, com grande homologia ao único promotor presente no gene de GR humano. Desta forma, diferenças na regulação gênica observadas nos ensaios de transfecção transitória e nos clones NIH3T3 *c-jun* gerados, poderiam ser

mediadas pelas regiões distintas entre os promotores do gene de GR humano e murino.

Uma das propostas iniciais do trabalho sugeria que c-Jun poderia regular a atividade do promotor de GR por se associar a um elemento semelhante a AP-1 presente tanto no promotor de GR humano como no de camundongo. Entretanto, nossos ensaios de retardamento de mobilidade eletroforética mostraram que a ligação de c-Jun ao elemento AP-1 do promotor de GR era muito baixa. Além disso, resultados do nosso grupo mostraram que a deleção da região do promotor que contém o elemento AP-1 não altera a atividade repressora de c-Jun sobre ele. Portanto, a regulação da expressão de GR por c-Jun parece não ser dada pela interação desta proteína com o elemento AP-1 contido no promotor do gene de GR.

Sabe-se que os promotores semelhantes do gene de GR murino e humano possuem vários sítios CRE (“AMP cyclic responsive elements”), aos quais c-Jun poderia se ligar (Ryseck e Bravo, 1991; Galien e cols, 1994). Portanto, a regulação poderia também ser mediada por estes elementos. Ensaios com mutantes de deleção devem ser realizados para avaliar esta hipótese.

É conhecido que o padrão de regulação do promotor de GR murino é bastante complexo (Wei e cols, 1996). A possibilidade de c-Jun poder interagir com outros fatores de transcrição na regulação da expressão gênica já foi extensamente estudada (DeCesare e cols, 1995; Schaefer e cols, 1995) e discutida anteriormente.

A existência de três promotores no gene de GR de camundongo associada à possibilidade de c-Jun poder interagir com fatores de transcrição que possuam elementos específicos nestes promotores abre

um caminho bastante complexo na relação c-Jun-expressão do gene de GR. Esta complexidade está ilustrada na análise dos clones NIH3T3 c-Jun obtidos.

Nossos dados demonstram que existe uma relação bastante importante entre altas concentrações de c-Jun e repressão da expressão de GR.

Como um paralelismo direto não pôde ser traçado, esta pode ser mais uma evidência de que a interação entre fatores transcricionais e a regulação da estabilidade dos RNAs mensageiros e proteínas, são características constantes do complexo mecanismo de regulação gênica.

CONCLUSÕES

1- A análise inicial dos valores relativos dos RNAs mensageiros de *c-jun* e GR mostrou que em clones de células transfectados com o proto-oncogene *c-jun* há aumento de RNAm de *c-jun* e decréscimo do RNAm de GR. Sugerindo que o aumento da expressão de c-Jun pode reprimir a expressão do gene de GR.

2- Ao relacionar os valores obtidos para os RNAs mensageiros e as respectivas proteínas não se obteve proporcionalidade entre estes dois eventos, o que sugere que mecanismos pós-transcricionais também podem estar envolvidos no processo. Foram obtidos clones que apresentam aumento do RNAm de *c-jun* (e da respectiva proteína) e decréscimo do RNAm de GR e da proteína receptora. Estes clones podem constituir ferramentas importantes para ensaios futuros.

3- Os ensaios de retardamento de mobilidade eletroforética evidenciaram que c-Jun não é capaz de se ligar ao elemento semelhante a AP-1 presente no promotor do gene de GR humano da mesma forma que o faz ao elemento AP-1 consenso. Desta forma, sugere-se que c-Jun não regula a atividade deste promotor por interação direta com este sítio.

4- Os mecanismos envolvidos com a regulação do gene de GR por c-Jun são complexos e podem ser mediados por interação entre diferentes fatores de transcrição, além de alterações na estabilidade dos RNAs mensageiros e respectivas proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDISON, T. On the constitutional and local effects of disease of suprarenal capsules. Samuel Highley, London, 1855.

ADLER, V.; PINCUS, M. R.; BRANDT-RAUF, P. W. e RONAI, Z. Complexes of p21^{RAS} with Jun N-terminal kinase and Jun proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10585-10589, 1995.

AIRES, M.M. Fisiologia básica. ed Guanabara Koogan Rio de Janeiro-R.J., 1986.

ALKSNIS, M.; BARKHEM, T.; STRÖMSTEDT, P.-E.; AHOLA, H.; KUTOH, E.; GUSTAFSSON, J. A.; POELLINGER, L. e NILSSON, S. High level expression of functional full length and truncated glucocorticoid receptor in Chinese hamster ovary cells. Demonstration of ligand-induced down-regulation of expressed receptor mRNA and protein. *J. Biol. Chem.* 266: 10078-10085, 1991.

ANGEL, P.; IMAGAWA, M.; CHIU, R.; STEIN, B.; IMBRA, R. J.; RAHMSDORF, H.J.; JONAT, C.; HERRLICH, P. e KARIN, M. Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell* 49: 729-739, 1987.

ARMELIN, M. C. S.; STOCCO, R. C. e ARMELIN H. A. Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in rat glioma cells. *J. Cell Biol.* 97: 455-458, 1983.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G. SMITH, J. A. e STRUHL, K. Current protocols in molecular biology, New York, Greene Publishing Associates, 1994.

BARBACID, M. *ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 779-827, 1987.

- BARNES, P. J. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N. Engl. J. Med.* 332: 868-875, 1995.
- BAXTER, J. e FUNDER, J. Hormone receptors. *N. Engl. J. Med.* 310: 1149-1161, 1979.
- BEATO, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344, 1989.
- BERKO-FLINT, Y.; LEVKOWITZ, G. e VARDIMON, L. Involvement of c-Jun in the control of glucocorticoid receptor transcriptional activity during development of chicken retinal tissue. *EMBO J.* 13 (3): 646-654, 1994.
- BINETRUY, B.; SMEAL, T. e KARIN, M. H-ras augments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351: 122-127, 1991.
- BIRNBOIM, H. C. e DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7: 1513, 1979.
- BOS, T.J.; BOHMAN, D.; TSUCHIE, H.; TIJIAN, R. e VOGET, P. K. v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell* 52: 705-712, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- BRENNER, D. A.; O'HARA, M.; ANGEL, P.; CHOJKIER, M. e KARIN, M. Prolonged activation of *jun* and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . *Nature* 337:661-663, 1989.
- BRINCKERHOFF, C.E.; PLUCINSKA, I.M.; SHELDON, A. e O'CONNOR, G.T. Half life of synovial cell collagenase mRNA is

- modulated by phorbol myristate acetate but not by all trans-retinoic acid or dexamethasone. *Biochemistry* 25:6378-6384, 1986.
- BURNETTE, W. N. "Western blotting" Eletrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195, 1981.
- BUSSE, W. W. What role for inhaled steroids in chronic asthma? *Chest* 104: 1565-1571, 1993.
- BYRAVAN, S.; MILHON, J.; RABINDRAN, S. K.; OLINGER, B.; GARABEDIAN, M. J.; DANIELSEN, M. e STALLCUP, M. R. Two point mutations in the hormone binding domain of the mouse glucocorticoid receptor that dramatically reduce its function. *Mol. Endo.* 5 (6): 752-758, 1991.
- CHEN, C. e OKAYAMA, H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6: 632-638, 1988.
- CIDLOWISK, J. A. e CIDLOWISK, N. B. Glucocorticoid receptors and the cell cycle: evidence that accumulation of glucocorticoid receptors during the S phase of the cell cycle is dependent on ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology* 110: 1653-1662, 1982.
- CIECHANOVER, A.; DiGIUSEPPE, J. A. BERCOVICG, B.; ORIAN, A.; RICHTER, J. D.; SCHWARTZ, A. L. e BRODEUR, G. M. Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro*. *Biochemistry* 88: 139-143, 1991.
- COHEN, D. R. e CURRAN, T. Fra-1: a serum inducible cellular immediate early gene that encodes a Fos-related antigen. *Mol. Cell. Biol.* 8 (5): 2063-2069, 1988.

- COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y. e HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl Acad. Sci.* 69: 210, 1972.
- COX, R. A. The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* 12:120-129, 1968.
- CRABB, D. W. e DIXON, J. E. Method for increasing the sensitivity of Chloramphenicol Acetyl Transferase assay in extracts of transfected cultured cells. *Anal. Biochem.* 163: 88-92, 1987.
- DANIELSEN, M.; NORTHROP, J. P. e RINGOLD, G. M. The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of a wild-type and mutated receptor proteins. *EMBO J.* 5: 2513-2522, 1986.
- DANIELSON, K.G.; OBORN, C. J.; DURBAN, E. M.; BUTEL, J. S. e MEDINA, D. Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis *in vivo* and functional differentiation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3756-3760, 1984.
- DeCESARE, D.; VALLONE, D.; CARACCIOLO, A.; SASSONE-CORSI, P.; NERLOV, C. e VERDE, P. Heterodimerization of c-Jun with ATF-2 and c-Fos is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. *Oncogene* 11: 365-376, 1995.
- DIAMOND, M. I.; MINER, J. N.; YOSHINAGA, S. K. e YAMAMOTO, K. R. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249: 1266-1272, 1990.
- DIGNAN, J. D.; LEOVITZ, R. M. e ROEDER, R. G. Accurate transcription initiation RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11: 1475-1489, 1983.

- DONG, Y. POELLINGER, L. GUSTAFSSON, J.-A. e OKRET, S. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 2: 1256-1264, 1988.
- DOPPLER, W.; GRONER, B. e BALL, R. K. Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat β -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 104-106, 1989.
- DOUCAS, V.; SPYROU, G. e YANIV, M. Unregulated expression of c-Jun or c-Fos proteins but not JunD inhibits oestrogen receptor activity in human breast cancer derived cells. *EMBO J.* 10: 2237-2245, 1991.
- ELLENBERGER, T. E.; BRANDL, C. J.; STRUHL, K. e HARRISON, S. C. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α -helices: crystal structure of the proteins DNA complex. *Cell* 71 (7): 1223-1237, 1992
- ESTEBAN, N. V.; LOUGHLIN, T; YERGEY, A. L.; ZAWADZKI, J. K.; BOOTH, J. D.; WINTERER, J. C. e LORIAUX, D. L. Daily cortisol production rate in man determined by stable isotope dilution / mass spectrometry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72: 39-45, 1991.
- EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895, 1988.
- FEINBERG, A. P. e VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13, 1983.
- FORT, P.; PIECHACZYK, M.; SABROUTY, S. E.; DANL, C.; JEANTEUR, P e BLANCHARD, H. Various rat adult tissues

- express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucl. Acid Res.* 13: 1431-1442, 1985.
- FRANZA, B. R.; STEVEN, F.; JOSEPHS, S. F.; GILMAN, M. Z.; RYAN, W. e CLARKSON, B. Characterization of cellular proteins recognizing the HIV enhancer using a microscale DNA affinity precipitation assay. *Nature* 330: 391-395, 1987.
- FREEDMAN, L. P.; LUISI, B. F.; KORSZUM, Z. R.; BASAVAPPA, R.; SIGLER, P.B. e YAMAMOTO, K. R. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334: 543-546, 1988.
- FRIED, M. e CROTHERS, D. M. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 9: 6505-6525, 1981.
- FRISCH, S. M. e RULEY, H. E. Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 262: 16300-16304, 1987.
- GALIEN, R.; EMANOIL-RAVIER, R. e MERCIER, G. Differential effects of *c-jun* and CREB on c-AMP response element activation by H-ras. *Oncogene* 9: 1101-1108, 1994.
- GARNER, M. M. e REVZIN, A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucl. Acids Res.* 9: 3047-3060, 1981.
- GIGUERE, V.; HOLLENBERG, S. M.; ROSENFELD, M. G. e EVANS, R. M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46: 645-652, 1986.

- GLISIN, V.; CRVENJAKOV, R e BYUS, C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13: 2633, 1973
- GLOVER, J. M. N. e HARRISON, S. C. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373: 257-261, 1995.
- GOLDSTEIN, R. A.; PAUL, W. E.; METCALFE, D. D.; BUSSE, W. W.; e REECE, E. R. Asthma. *Ann. Inter. Med.* 121:698-708, 1994.
- GORMAN, C. M.; MERLINO, G. T.; WILLINGHAM, M. C.; PASTAN, I. e HOWARD, B. H. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6777-6781, 1982.
- GREEN, S.; WATER, P.; KULMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J. M.; ARGOS, P. e CHAMBON, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb A. *Nature* 320: 134-139, 1986.
- GREENBERG, M. E.; HERMANOWSKI, A. L. e ZIFF, E. B. Effect of protein synthesis inhibitors of growth factor activation of c-fos, c-myc and actin gene transcription *Mol. Cell. Biol.* 6: 1050-1057, 1986.
- GREENBERGER, J. S.; DAVISSON, P. B. e GANS, P. J. Murine sarcoma viruses block corticosteroid-induced differentiation of bone marrow preadipocytes associated with long-term *in vitro* hemopoiesis. *Virology* 95: 317-333, 1979.
- GREENBERGER, P.A. Corticosteroids in asthma. Rationale use and problems. *Chest* 101:418S-421S, 1992.
- GUPTA, S.; CAMPBELL, D., DÉRIJARD, B. e DAVIS, R. J. Transcription factor ATF-2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267: 389-393, 1995.

- GUYTON, A. C. Tratado de fisiologia médica. ed. Guanabara Koogan 7ªed, 1989 (Textbook of Medical Physiology- W.B. Saunders Company ed. 1986)
- GUZZO, C. A. e WERTH, V. P. Dermatological pharmacology. In: Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics 9ª ed. Perry B. Molinoff e Raymond W. Ruddon eds. Mc Graw Hill Companies, Inc. NY, 1996.
- HAMILTON, B. J. e DeFRANCO, D. Glucocorticoid and cAMP induction mechanisms are differentially affected by the p85^{gag-mos} oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 597-601, 1989.
- HARMON, J.M.; NORMAN, M.R.; FOWLKES, B.J. e THOMPSON, E.B. Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. *J. Cell Physiol.* 98: 267-278, 1979.
- HAUBRUCK, H. e McCORMICK, F. Ras p21: effects and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1072: 215-229, 1991.
- HENDRICKSON, W. e SCHLEIF, R. F. Regulation of the Escherichia coli L-arabinose operon studied by gel electrophoresis DNA binding assay. *J. Mol. Biol.* 174: 611-628, 1984.
- HERMIDA-MATSUMOTO, M. L.; CHOCK, P. B.; CURRAN, T. e YANG, D. C. Ubiquitinylation of transcription factors c-Jun and c-Fos using reconstituted ubiquitinylation enzymes. *J. Biol. Chem.* 271 (9): 4830-4936, 1996.
- HIRAI, S. I.; RYSECK, R.-P.; MECHTE, F.; BRAVO, R e YANIV, M. Characterization of JunD: a new member of the *jun* proto-oncogene family. *EMBO J.* 8: 1433-1439, 1989.
- HOECK, W.; RUSCONI, S. e GRONER, B. Down regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cells.

- Investigations with a nonspecific antiserum against a bacterially expressed receptor fragment. *J. Biol. Chem.* 264: 14396-14402, 1989.
- HOLLENBERG, S. M. e EVANS, R. M. Multiple and cooperative transactivation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55: 899-906, 1988.
- HOUSLEY, P. R. e FORSTHOEFEL, A. M. Isolation and characterization of a mouse L cell variant deficient in glucocorticoid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 164: 480-487, 1989.
- ISACSSON, U e WATERMARK, G. Chemiluminescence in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 68: 339-362, 1974.
- ISH-HOROWICZ, D. e BURKE, J. F. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acid Res.* 9: 2989, 1981.
- JAGGI, R.; HÖCK, W.; ZIEMIEKI, A.; KLEMENZ, R.; FRIIS, R. e GRONER, B. Oncogene mediated repression of glucocorticoid hormone response elements and glucocorticoid receptor levels. *Cancer Res.* 49: 2266s-2274s, 1989.
- JAGGI, R.; SALMONS, B.; MUELLENER, D. e GRONER, B. The v-mos and H-ras oncogene expression represses glucocorticoid hormone-dependent transcription from the mouse mammary tumor virus LTR. *EMBO J.* 5 (10): 2609-2616, 1986.
- JOAB, I.; RADANYL, C.; RENOIR, J. M.; BUCHOU, T.; CATELLI, M. G.; MESTER, J. e BAULIEU, E. E. Common non-hormone binding component in non-transformed chicken oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* 308: 850-853, 1984.
- JONAT, C.; RAHMSDORF, H. J.; PARK, K. K.; CATO A. B. GEBEL, S.; PONTA, H. e HERRLICH, P. Antitumor promotion and

- antiinflammation: down-modulation of AP-1 (*fos/jun*) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62: 1189-1204, 1990.
- JURDIC, P.; TREILLEUX, I.; VANDEL, L.; TABONE, E.; HUGUIER, S.; SERGEANT, A. e CASTELLAZZI, M. Tumor induction by v-*jun* homodimers in chickens. *Oncogene* 11: 1699-1709, 1995.
- KATAOKA, K.; FUJIWARA, K. T.; NODA, M. e NISHIZAWA, M. Maf B, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with c-Jun. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7581-7591, 1994
- KATAOKA, K.; IGARASHI, K.; ITOH, K.; FUJIWARA, K. T.; NODA, M.; YAMAMOTO, M. e NISHIZAWA, M. Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2180-2190, 1995.
- KATAOKA, K.; NISHIZAWA, M. e KAWAI, S.. Structure-function analysis of the *maf* oncogene product, a member of the b-Zip protein family. *J. Virol* 67: 2133-2141, 1993.
- KOROLKOVAS, A. e BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica. Editora Guanabara Dois S. A. -Rio de Janeiro. R. J.- p 201-204, 1982.
- KOVARY, K. e BRAVO, R. Existence of different *fos/jun* complexes during the G0/G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins. *Mol. Cell Biol.* 12 (11): 5015-5023, 1992.
- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1987.

LANDSCHULTZ, W. H.; JOHNSON, P. F. e McKNIGHT, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764, 1988.

LEE, W.; MITCHELL, P. e TJIAN, R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49: 741-752, 1987.

LIDDLE, G. W. The adrenals. In textbook of endocrinology, R.H.Williams, ed (Philadelphia:W.B.Saunders) 249-292, 1981.

LIN, A.; MINDEL, A.; MARTINETTO, H.; CALRET, F.-X.; LANGE-CARTER, C.; MERCURIO, F.; JOHNSON, G. L. e KARIN, M. Identification of a dual specificity kinase that activates Jun kinases and p38-mpk2. *Science* 268: 286-290, 1995.

LIPWORTH, B. J. Clinical pharmacology of corticosteroids in bronchial asthma. *Pharmacol. Ther.* 58:173-209, 1993.

LOOSFELD, H.; ATGER, M.; MISRAMI, M.; GUIOCHON-MANTEL, A.; MERIEL, C.; LOGEAT, F.; BENAROUS, R. e MILGROM, E. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9045-10049, 1986.

LOWY, D. R. e WILLUMSEM, B. M. Function and regulation of Ras. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 851-891, 1993.

LUISI, B. F.; YU, W. X.; OTWINOWSKI, Z.; FREEDMAN, L. P.; YAMAMOTO, K. R. e SIGLER, P. B. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352: 497-505, 1991.

MAC GREGOR, G. R. e CASKEY, C. T. Construction of plasmids that express *E. coli* β galactosidase in mammalian cells. *Nucl. Acid Res.* 17: 2365, 1989.

- MANDEL, M. e HIGA, A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159, 1970.
- MARSHALL, M. S. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J.* 9: 1311-1318, 1995.
- MARTINS, V. R. e BRENTANI, M. M. The effects of ras gene expression on glucocorticoid receptors in mouse fibroblast. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37: 183-193, 1990.
- MARTINS, V. R.; BRENTANI, M. M. e HOUSLEY, P. R. Attenuation of glucocorticoid receptor levels by H-ras oncogene. *Endocrine* 3: 305-312, 1995.
- MATSUI, M.; TOKUHARE, M.; KONUMA, Y.; NOMURA, N. e ISHIZAKI, R. Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene* 5: 249-255, 1990.
- McFADDEN, E.R. Jr. Dosages of corticosteroids in athma. *Am. Rev. Resp. Dis.* 147: 1306-1310, 1993.
- McINTYRE, W. R. e SAMUELS, H. H. Triancinolone acetone regulates glucocorticoid receptor levels by decreasing the half-life of the activated nuclear receptor form. *J. Biol. Chem.* 260: 418-427, 1985.
- NEPVEU, A. e MARCU, K. Intragenic pausing and antisense transcription within the murine c-myc locus. *EMBO J.* 5 (11): 2859-2865, 1986.
- NISHIKURA, K. e MURRAY, J. M. Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 7 (2):639-649, 1987.

- NISHINA, H.; SATO, H.; SUZUKI, T.; SATO, M. e IBA, H. Isolation and characterization of fra-2, an additional member of fos gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3619-3623, 1990.
- OHNO, H.; GOTO, S.; TAKI, S.; SHIRASAWA, T.; NAKANO, H.; MIYATAKE, S.; AOE, T.; ISHIDA, Y.; MAEDA, H.; SHIRAI, T.; REJEWSKY, K. e SAITO, T. Target disruption of the CD3n locus causes high lethality in mice: modulation of Oct-1 transcription on the opposite strand. *EMBO J.* 13 (5): 1157-1165, 1994.
- O'MALLEY, B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endo.* 4 (3): 363-369, 1990.
- OISHI, M. e COSLOY, S. D. The genetic and biochemical basis of the transformability of Escherichia coli K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49: 1568, 1972.
- OKRET, S.; DONG, Y; BRONNEGARD, M e GUSTAFSSON, J. A. Regulation of glucocorticoid receptor expression. *Biochimie* (73): 51-59, 1991.
- OSSOWSKI, L.; BIEGEL, D. e REICH, E. Mammary plasminogen activator. Correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell* 16: 929-940, 1979.
- PAPAVASSILIOU, A.G.; TREIR, M e BOHMAN, D. Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J.* 14 (9): 2014-2019, 1995.
- PAVORD, I. e KNOX, A. Pharmacokinetic optimisation of inhaled steroid therapy in asthma. *Clin. Pharmacokinetic.* 25:126-135, 1993.
- PFAHL, M. Nuclear receptor/ AP-1 interaction. *Endocrine Reviews* 14 (5): 651-658, 1993.

- PICARD, D. e YAMAMOTO, K. R. Two signals mediate hormone dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6: 3333-3340, 1987.
- PILKIS, S. J. e GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann.Rev.Physiol.* 54:885-909, 1992.
- PRATT, W. B.; JOLLY, D. J.; PRATT, D. V.; HOLLENBERG, S. M.; GIGUERE, V.; CADEPOND, F. M.; SCHWEIZER-GROYER, G.; CATELLI, M.-G.; EVANS, R. M. e BAULIEU, E.-E. A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9S glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.* 263 (1): 267-273, 1988.
- PRONK, G. J. e BOS, J. L. The role of p21 ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 131-147, 1994.
- PTASHNE, M. How eucaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335: 683-689, 1988.
- PUISSANT, C. e HOUDEBINE, L. M. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* 8: 148-149, 1990
- REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. *N.Engl.J.Med.* 329:1246-1253, 1993.
- REICHMANN, E.; BALL, R.; GRONER, B. e Friis, R. R. New mammary epithelial and fibroblastic cell clones in coculture from structures competent to differentiate functionally. *J.Cell. Biol.* 108: 1127-1138, 1989.
- RESAR, L. M. S.; DOLDE, C.; BARRETT, J. F. e DANG, C. V. B-Myc inhibits neoplastic transformation and transcriptional activation by c-Myc. *Mol. Cell. Biol.* 13 (2): 1130-1136, 1993.

- ROSEWELL, D. F. e WHITE, E. H. The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzimol.* 57: 409-423, 1978.
- RYDER, K.; LANAHAN, A.; PEREZ-ALBUERNE, E. e NATHANS, D. JunD: a third member of the *jun* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1500-1503, 1989.
- RYDER, K.; LAU, L. F. e NATHANS, D. A gene activated by growth factor is related to the oncogene *v-jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1487-1491, 1988.
- RYSECK, R.-P. e BRAVO, R. c-Jun, JunB and JunD differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogene* 6: 533-542, 1991.
- RYSECK, R.-P.; HIRAI, S. I.; YANIV, M. e BRAVO, R. Transcriptional activation of c-Jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* 333: 535-537, 1988.
- SABBAH, M.; REDEVITH, G.; SECCO, C. e BAULIEU, E. E. The binding activity of the estrogen receptor to DNA and heat shock protein (MR90,000) is dependent on receptor-bound metal. *J. Biol. Chem.* 262 (18): 8631-8635, 1987.
- SAKAI, D. D.; HELMS, S.; CARLSTEDT-DUKE, J.; GUSTAFSSON, J. A.; ROTTMAN, F. M. e YAMAMOTO, K.R. Hormone mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.* 2: 1144-1154, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANCHEZ, E. R.; MESHINCHI, S.; TIENRUNGROJ, W.; SCHLESINGER, M. J.; TOFT, D. O. e PRATT, W. B. Relationship of the 90-kDa murine heat shock protein to the untransformed and

- transformed states of the L-cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 262 (15): 6986-6991, 1987.
- SANCHEZ, E. R.; TOFT, D. O.; SCHLESINGER, M. J. e PRATT, W. B. Evidence that the 90 kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 260 (23): 12398-12401, 1985.
- SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 600-672, 1949.
- SCHAEFER, T. S.; SANDERS, L. K. e NATHANS, D. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 β , a short form of Stat3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9097-9101, 1995.
- SCHERRER, L. C.; PICARD, D.; MASSA, E.; HARMON, J. M.; SIMONS, S. S.; YAMAMOTO, K. R. e PRATT, W. B. Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry* 32 (20): 5381-5386, 1993.
- SCHIMMER, B. P. e PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone. Adrenocortical steroids and their syntetic analogs, inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics 9^a ed. Perry B. Molinoff e Raymond W. Ruddon eds. Mc Graw Hill Companies, Inc. NY, 1996.
- SCHÖNTAL, A.; HERRLICH, P.; RAHMSDORF, H. e PONTA, H. Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esteres. *Cell* 54: 325-334, 1988.

- SCRIBNER, J.D. e SLAGA, T.J. Multiple effects of dexamethasone on protein synthesis and hyperplasia caused by a tumor promoter. *Cancer Res.* 33:542-546, 1973.
- SMEAL, T; BINETRUY, B.; MERCOLA, D. A.; BIRRER, M. e KARIN, M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354: 494-496, 1991.
- SOUTHERN, P. J. e BERG, P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control to the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 327-341, 1982.
- SPANJAARD, R. A. e CHIN, W. W. Reconstitution of ligand-mediated glucocorticoid receptor activity by trans-acting functional domains. *Mol. Endocrinol.* 7 (1): 12-16, 1993.
- SPELSBERG, T. C.; RUH, T.; RUH, M.; GOLDBERGER, A.; HORTON, M.; HORA, J. e SINGH, R. Nuclear acceptor sites for steroid hormone receptors: comparisons of steroids and antisteroids. *J. Steroid Biochem.* 31(48): 579-592, 1988.
- STEIN, B.; RAHMSDORF, H. J.; SCHÖNTAL, A.; BÜSCHER, M.; PONTA, H. e HERRLICH, P. The UV induced signal transduction pathway to specific genes. In Mechanisms and consequences of DNA damage processing, E. Friedberg and p. hanawalt, eds. (New York: Alan R. Liss, Inc.) 557-570, 1988.
- STEIN, B.; RAHMSDORF, H. J.; STEFFEN, A.; LITFIN, M. e HERRLICH, P. UV induced DNA damage in an intermediate in the UV induced expression of HIV-1, collagenase, c-fos and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5169-5181, 1989.
- STEINBERG, R. A.; LEVINSON, B. B.; e TOMKINS, G. M. Kinetics of steroid induction and deinduction of tyrosine aminotransferase

synthesis in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2007-2011, 1975.

STRAHLE, U.; SCHMIDT, A.; KESLEY, G.; STEWART, A. F.; COLE, T. J.; SCHMIDT, W. e SCHULTZ G. At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6731-6735, 1992.

SULZBERGER, M. B. e WITTEN, V. H. The effect of topically applied compound F in selected dermatoses. *J. Invest. Dermatol.* 19: 101-102, 1952.

THOMPSON, C. B. CHALLONER, P. B. NEIMAN, P. E. e GROUDINE, M. Expression of the *c-myb* proto-oncogene during cellular proliferation. *Nature* 319: 374-380, 1986.

TOWBIN, H. STAEHELIN, T e GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350, 1979.

TSAI S. Y.; CARLSTEDT-DUKE, J.; WEIGEL, N. L.; DAHLMAN, K.; GUSTAFSSON, J.-A.; TSAI, M.-J. e O'MALLEY, B.W. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 55: 361-369, 1988.

TSAI, S. L.; TSAI, M-J. e O'MALLEY, B.W. Cooperative binding of the steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* 57: 443-448, 1989.

VALENTINI, S.R. e ARMELIN, M.C.S. Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/St1 rat glioma phenotypic reversion. *J. of Endocrinol.* 148: (1) 11-17, 1996.

VANDERBILT, J. N.; MIESFELD, R.; MALER, B. A. e YAMAMOTO, K. R. Intracellular receptor concentration limits

- glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Mol. Endo.* 1 (1): 68-74, 1987.
- VEDECKIS, W. V.; ALI, M. e ALLEN, H. R. Regulation of glucocorticoid receptor protein and mRNA levels. *Cancer Res.* 49: 2295s-2302s, 1989.
- VIG, E. e VEDECKIS, W. V. *Proceedings of the 74th Annual Meeting of the American Endocrine Society*, 1239: 361, 1992.
- WEI, P.; BRESLIN, M.B. e VEDECKIS, W. V. Evidence for cross-talk between the glucocorticoid receptor and the AP-1 transcription factor. *Proceedings of American Association for Cancer Research- San Francisco- CA* 37, 1996.
- WESTWICK, J. K. COX, A. D.; DER, C. J.; COBB, M. H.; KARIN, M. e BRENNER, D. A. Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6030-6034, 1994.
- WHITEHEAD, T. P.; KRICKA, L. J.; CARTER, T. J. N. e THORPE, G. H. G. Analytical Luminescence: Its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 25: 1531-1546, 1979.
- YU, C.; WARRIAR, N. e GOVINDAN, M. V. Cysteines 638 and 665 in the hormone bindin domain of glucocorticoid receptor define the specificity to glucocorticoids. *Biochemistry* 34: 14163-14173, 1995.
- ZERIAL, M.; TOSCHI, L.; RYSECK, R.-P.; SCHUERMANN, M.; MÜLLER, R. e BRAVO, R. The product of a novel growth factor activated gene, fosB, interacts with Jun proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* 8: 805-813, 1989.

ZONG, J.; ASHIRAF, J. e THOMPSON, E. B. The promoter and firsth untranslated exon of the human GR gene or GC rich but lack consensus GRE sites. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5580-5585, 1990.