

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
"FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF)"
RECOMBINANTE**

CATARINA AKIKO MIYAMOTO

Dissertação de Mestrado submetida ao Departamento de
Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de
São Paulo.

Orientador: Dr. Angelo G. Gambarini

SÃO PAULO
1992

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE "FIBROBLAST GROWTH FACTOR
(FGF)" RECOMBINANTE**

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

Aprovada por:

Prof. Dr. Angelo Geraldo Gambarini
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Suely Lopes Gomes, IQ-USP

Prof. Dr. Osvaldo Marinotti, ICB-USP

SÃO PAULO, SP

12 DE MARÇO DE 1992

AGRADECIMENTOS

Ao Angelo Gambarini pela orientação e incentivo na realização deste trabalho;

Ao Dr. Hugo Armelin por ter me aberto as portas deste laboratório e discussões sempre proveitosas;

A Eico Kimura pela colaboração em momentos importantes durante a realização deste trabalho;

Ao Ronaldo Bento Quaggio pelas dicas e discussões sobre a arte da subclonagem e auxílio no manuseio dos programas de computação;

A Katia Maria da Rocha, amiga essencial, prestativa e presente em todos os momentos difíceis, pelo auxílio incondicional e discussões agradáveis;

A Claudia Frigeri, amiga leal, pela presença marcante, convivência agradável e apoio técnico;

A Cecília Bonilha, pela amizade e companheirismo;

A D. Joana Criscuolo, pelo cuidado na preparação do material do laboratório e carinho;

A Sheila Jensen, Marcella Faria e Ana Paula Lepique, pela amizade;

A Mineko Tominaga, pelos bons conselhos e ombro amigo;

Ao Paulo Lee Ho, pela amizade e discussões valiosas;

Ao Chuck Farah, pela revisão do "summary" e auxílio no manuseio do programa macplasmag;

Ao Flávio Henrique "Mineirinho", pelo auxílio no sequenciamento do DNA e amizade;

Ao Fernando Reinach, pelo vetor e cepas bacterianas;

A Martha Sonobe e Mari Armelin, pelo vetor pUC19;

Ao Dorry e Wilton, pelos oligonucleotídeos;

A Lúcia, Cassandra, Sandro, Zizi, Eduardo, Ricardo, Claudio, Eugênia e Emerson, pelas boas festinhas;

A Kumie e Ana Claudia, pelo incentivo e bate-papos formais e informais;

Ao Marcelo, pela revisão final do texto e seriedade por vezes burlada;

A Franca, pelo auxílio na análise de aminoácidos;

Ao Pio Colepicolo, Denise e Horácio, pela gentileza de emprestar o computador Macintosh para a realização dos gráficos dos plasmídeos;

A Moema, pela revisão das referências bibliográficas;

A Dra. J. A. Abraham (California Biotechnology, Inc., CA, USA), por ter cedido os plasmídeos pJC3-5 e pJJ11-1;

Ao Dr. F. W. Studier (Brookhaven National Lab., NY, USA), por ter permitido o uso do plasmídeo pET3-d;

Ao Dr. W. McKeehan (W. Alton Jones Cell Science Center, NY, USA), por ter cedido o antisoro anti-aFGF Y-34-A;

Ao Ricardo "Zé", Patrícia, Jonny, Hioka, Mercedes, Palmira, Mauricinho, Xuds, Abrahão e Pepe, pela bagunça do dia-a-dia;

Aos laboratórios do IQ pelos empréstimos dos aparelhos dos quais necessitei;

Ao CNPq, FAPESP e FINEP, pelos auxílios concedidos;

Ao Fábio e Ana Paula, pela amizade e carinho sempre constantes.

RESUMO

Este trabalho descreve a produção dos FGFs básico bovino (bb) e ácido humano (ha) em *E. coli* utilizando o vetor pET. Para expressar o haFGF utilizamos o cDNA nativo com pequenas modificações, obtendo cerca de 40 mg da proteína por litro de cultura induzida. No caso do bbFGF, cerca de 60 pares de bases da extremidade 5' do cDNA nativo foram substituídos por oligonucleotídeos sintéticos contendo codons frequentemente usados em genes bacterianos altamente expressos e apresentando menor conteúdo de C+G do que a sequência nativa. Com este cDNA modificado, obteve-se cerca de 10 mg l⁻¹ de bbFGF. Os FGFs intracelulares solúveis foram purificados a partir do extrato bacteriano por cromatografia de afinidade em Heparina-Sepharose atingindo um grau de pureza da ordem de 95%. O haFGF sozinho é ativo sobre fibroblastos 3T3 em cultura na concentração de ng ml⁻¹; na presença de heparina, a atividade desloca-se para a faixa de pg ml⁻¹. O bbFGF é ativo na concentração de pg ml⁻¹ e sua atividade não é significativamente potenciada pela heparina. O sequenciamento da extremidade N-terminal e a análise de aminoácidos mostraram somente uma forma de haFGF recombinante correspondente à proteína autêntica de 154 aminoácidos. Foram encontradas duas formas de bbFGF recombinante, uma correspondente à proteína autêntica de 154 resíduos e outra contendo 153, onde os dois primeiros foram removidos.

SUMMARY

Here we describe the use of the pET expression system to produce the 154 amino acid bovine basic (bb) and human acidic (ha) FGFs. To express haFGF we have used the native cDNA sequence with minor modifications, obtaining about 40 mg of growth factor per liter of bacterial culture. In the case of bbFGF, about 60 base pairs from the 5'-end of the native cDNA were replaced with synthetic oligonucleotides containing codons frequently used in highly expressed bacterial genes and having a lower G+C content than the native sequence. By using this modified cDNA about 10 mg l⁻¹ of bbFGF was obtained. The intracellular, soluble FGFs were partially purified from bacterial extracts by heparin-affinity chromatography and shown to be more than 95% pure. The haFGF alone is active upon 3T3 fibroblasts in culture at the level of ng ml⁻¹ or in the range of pg ml⁻¹ when heparin is added to the incubation medium. The bbFGF is active in the range of pg ml⁻¹ and its activity is not significantly potentiated by heparin. Only one form of recombinant haFGF corresponding to the authentic protein of 154 amino acids was found by N-terminal protein sequencing and amino acid analysis. Two forms of recombinant bbFGF were found, one corresponding to the authentic protein of 154 amino acids (about 75%) and another containing 153 amino acids where the first two residues were removed (about 25%).

ABREVIATURAS

a - ácido

A₂₆₀ - Absorbância a 260 nm

A₂₈₀ - Absorbância a 280 nm

A₆₀₀ - Absorbância a 600 nm

ATP - adenosina trifosfato

b - básico ou bovino

BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato

bp - pares de bases

cDNA - DNA complementar

CHAPS - "3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate

DE_{50%} - dose de estimulação correspondente a 50% de resposta

DEAE - dietilaminoetil

DME - meio de Eagle modificado por Dulbecco

DTT - ditionitrosol

EDTA - ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico

FCS - soro fetal bovino

GAG - glicosoaminoglicano

GET - tampão Glicose-EDTA-Tris

h - humano

I - induzido

IPTG - isopropil-β-D-tiogalactosídeo

K - peso molecular obtido pela comparação com padrão

Kb - Kilobases

KDa - KiloDalton

LB - meio de Luria-Bertani para cultura de bactérias

LBA - meio de Luria-Bertani contendo antibiótico

MCS - sítio múltiplo de clonagem

min. - minuto

mRNA - RNA mensageiro

NBT - nitroblue tetrazolium

NI - não induzido

PBS - solução salina tamponada com fosfato

PBSA - solução salina tamponada com fosfato sem cálcio e magnésio

PI - ponto isoelétrico
PITC - fenilisotiocianato
PM - peso molecular
PMSF - "phenylmethane sulfonyl fluoride"
r.c. - região codificadora
RBS - sítio de ligação ao ribossomo
rpm - rotações por minuto
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
seg. - segundo
SNC - sistema nervoso central
STET - tampão Tris-EDTA-Sacarose-Triton X-100
TBE - tampão Tris-Borato-EDTA
TE - tampão Tris-EDTA
TF - tampão fosfato
v - volume

INDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Histórico.....	02
1.2. Atividades dos FGFs.....	03
1.3. Estrutura primária dos FGFs ácido e básico.....	04
1.3.1. Estrutura primária do bFGF.....	05
1.3.2. Estrutura primária do aFGF.....	07
1.3.3. Análise das estruturas dos FGFs.....	09
1.4. Organização dos genes.....	10
1.5. Expressão dos FGFs recombinantes.....	11
1.6. Objetivos.....	12
2. MATERIAIS E METODOS.....	13
2.1. Vetores.....	13
2.2. Hospedeiros.....	16
2.3. Transformação de <i>E. coli</i> com DNA plasmidial.....	16
2.4. Extração de DNA plasmidial.....	17
2.5. Purificação do DNA plasmidial em CsCl.....	18
2.6. Mini-preparações de plasmídeos.....	19
2.7. Eletroforese em gel de agarose.....	19
2.8. Recuperação de fragmentos de DNA através de eletroforese sobre membrana de DEAE-celulose.....	20
2.9. Reação de ligase.....	21
2.10. Dessalinização de oligonucleotídeos sintéticos: cromatografia de gel-filtração em coluna de Sephadex G-25 DNA.....	21
2.11. Hibridização e fosforilação dos oligonucleotídeos.....	23
2.12. Estratégias utilizadas para subclonagens.....	23
2.12.1. Subclonagem de haFGF em pKK233-2.....	23
2.12.2. Subclonagem de haFGF em pET-3d.....	24
2.12.3. Subclonagem de bbFGF em pET-3d.....	25
2.13. Sequenciamento de DNA.....	28
2.14. Eletroforese de sequenciamento de DNA.....	28
2.15. SDS-PAGE.....	29
2.16. Western-Blotting.....	29

2.17. Sistema de expressão usando vetor pKK.....	30
2.18. Sistema de expressão usando vetor pET.....	30
2.19. Indução da expressão de proteínas em <u>E. coli</u>	31
2.19.1. Indução da expressão de haFGF utilizando pKK233-2.....	31
2.19.2. Indução da expressão de haFGF e bbFGF utilizando pET-3d.....	32
2.20. Preparação das amostras de proteínas.....	32
2.20.1. Mini-preparações de proteínas.....	32
2.20.2. Preparações das amostras de proteínas em larga escala utilizando vetor pET-3d.....	33
2.21. Cromatografia de afinidade em coluna de Heparina- Sepharose (HS).....	33
2.22. Ensaio de atividade biológica.....	34
2.23. Dosagem de proteína.....	35
 3. RESULTADOS.....	 36
3.1. Transformação de <u>E. coli</u>	36
3.2. Extração e purificação de DNA plasmidial.....	37
3.3. Obtenção dos plasmídeos de expressão de FGF.....	40
3.3.1. Obtenção de pJKA-1.....	40
3.3.2. Obtenção de pJEA-1.....	44
3.3.3. Obtenção de pJEB-1.....	45
3.4. Expressão das proteínas.....	48
3.4.1. Expressão em pequena escala de haFGF com pKK233-2.....	48
3.4.2. Expressão de haFGF e bbFGF com pET-3d.....	50
3.4.2.1. Expressão em pequena escala.....	50
3.4.2.2. Expressão em larga escala.....	53
3.5. Purificação dos FGFs.....	53
3.5.1. Purificação de haFGF e ensaio de atividade mitogênica das frações cromatográficas.....	53
3.5.1.1. Eluição através de gradiente de NaCl por etapas.....	53
3.5.1.2. Eluição através de gradiente linear de NaCl.....	57

3.5.2. Purificação de bbFGF e ensaio de atividade mitogênica das frações cromatográficas.....	62
3.6. Análises da composição e sequenciamento de amino-ácidos dos FGFs produzidos.....	65
4. DISCUSSÃO.....	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

INDICE DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1: Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da região codificadora do cDNA do bFGF bovino 06
- Figura 2: Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da região codificadora do cDNA de aFGF humano 08
- Figura 3: Esquema dos fragmentos de DNA de haFGF e de bbFGF inseridos em pJC3-5 e pJJ11-1, respectivamente. (a) pJC3-5 - haFGF+pBR329 e (b) pJJ11-1 - bbFGF+pBR322 14
- Figura 4: Plasmídeos de expressão utilizados. (a) pKK233-2; (b) pET3-d 15
- Figura 5: (a) Extremidade 5' da região codificadora nativa de bbFGF que foi substituída pelos 4 oligonucleotídeos sintéticos; (b) Desenho dos 4 oligonucleotídeos que foram sintetizados para substituir a extremidade 5' da região codificadora nativa de bbFGF 22
- Figura 6: Eletroforese de pET3-d e do fragmento de haFGF após digestão com NcoI-HindIII 24
- Figura 7: Principais sítios de restrição do cDNA nativo de bbFGF 26
- Figura 8: Esquema de subclonagem de bbFGF em pET3-d 27
- Figura 9: Eletroforese das preparações de vários DNAs plasmidiais (forma "supercoil") 38
- Figura 10: Eletroforese das preparações de DNAs plasmidiais após digestão com HindIII 39
- Figura 11: Eletroforese dos plasmídeos dos clones isolados da placa proveniente da suspensão 2 (Tabela IV), digeridos com HindIII 41
- Figura 12: Eletroforese dos 6 clones digeridos com HindIII e EcoRI que apresentaram aumento no "PM" após digestão com HindIII 43
- Figura 13: Plasmídeos com bbFGFmodif. 47

Figura 14: Western-blotting das frações protéicas das amostras induzidas (I) e não induzidas (NI) dos clones 2, 4, 5, 7, 9 e 10 de haFGF utilizando sistema pKK	49
Figura 15: SDS-PAGE para verificação do nível de expressão de haFGF utilizando sistema pET	51
Figura 16: SDS-PAGE de 1 clone que não expressou e de 3 que expressaram bbFGF utilizando sistema pET	52
Figura 17: Eluição de haFGF através de gradiente por etapas de NaCl	55
Figura 18: Purificação de haFGF utilizando-se gradiente de NaCl por etapas	56
Figura 19: Eluição de haFGF através de gradiente linear de NaCl	59
Figura 20: Purificação de haFGF utilizando-se gradiente linear de NaCl	60
Figura 21: Curva de dose-resposta do haFGF e efeito de duas concentrações da heparina na atividade do haFGF	61
Figura 22: Eluição de bbFGF através de gradiente linear de NaCl	63
Figura 23: Purificação de bbFGF através de gradiente linear de NaCl	64
Tabela I: Seleção de bactérias transformantes em placas LBA	36
Tabela II: Concentração de DNA plasmidial estimada após extração	37
Tabela III: Concentração de DNA plasmidial (forma "supercoil" após purificação em gradiente de cloreto de césio	38
Tabela IV: Clones transformados pela reação de ligação pKK233-2 + haFGF	40
Tabela V: Resultados de transformação de <i>E. coli</i> HMS174 com os plasmídeos gerados da ligação de pET3-d (NcoI-HindIII) + haFGF (NcoI-HindIII)	44

1. INTRODUÇÃO

Fatores de crescimento polipeptídicos são moduladores da proliferação e da diferenciação celular *in vitro* e *in vivo*. Estas respostas são desencadeadas, em parte, pela interação destes fatores com receptores de alta afinidade localizados na superfície celular. A sequência de reações iniciada pela ocupação dos receptores pelos fatores de crescimento não está ainda estabelecida completamente. A regulação anormal de uma ou mais destas reações é um dos fatores que explicaria o mecanismo dos oncogenes celulares e os fenótipos resultantes associados com transformação celular (Burgess & Maciag, 1989).

Um desses fatores é o "Fibroblast Growth Factor" (FGF), que constitui uma família composta de sete polipeptídeos com propriedades estruturais, bioquímicas e biológicas similares (Burgess & Maciag, 1989; Thompson & cols., 1991; Baird & Klagsbrun, 1991).

Com a disponibilidade de proteínas purificadas, sondas de cDNAs e anticorpos, o conhecimento das propriedades estruturais e biológicas dos FGFs expandiu-se grandemente. Atualmente, sabe-se que: 1.) são fatores multifuncionais que têm atividades mitogênica, quimiotática, neurotrófica e angiogênica *in vitro* e *in vivo*; 2.) são codificados por uma família de genes, contendo pelo menos sete membros; 3.) interagem com múltiplos receptores de alta e de baixa afinidades; 4.) associam-se com heparina e com o proteoglicano heparan sulfato existente nas superfícies celulares e na matriz extracelular; 5.) têm um importante papel nos processos do desenvolvimento (Baird & Klagsbrun, 1991). Devido a estas propriedades os FGFs podem ser explorados clinicamente.

1.1. Histórico

A motivação para a identificação dos FGFs originou-se com a proposição de que fatores solúveis eram responsáveis pela regulação de uma variedade de processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento, regeneração e cicatrização.

Em 1939, extratos de cérebro foram citados como fontes ricas de fatores que promoviam a proliferação de fibroblastos *in vitro* (Burgess & Maciag, 1989). No final da década de 60 e início da de 70, verificou-se que preparações dos hormônios estimulante de tireóide (derivado da hipófise) e luteinizante continham um potente polipeptídeo mitogênico para células de camundongo 3T3 e condrócitos. Armelin (1973) descreveu os efeitos de extratos hipofisários sobre o crescimento de células 3T3 propondo a existência de um regulador da proliferação destas células. Gospodarowicz (1975) purificou e caracterizou parcialmente o polipeptídeo a partir de extratos ácidos de hipófises bovinas, como uma proteína de pI 9,6 e PM 13,5 KDa. A composição de aminoácidos e o resíduo N-terminal (lisina) foram determinados. Este polipeptídeo foi denominado "fibroblast growth factor". Subsequentemente, mostrou-se que ele era mitogênico para uma grande variedade de células derivadas do mesoderma e neuroectoderma. Gospodarowicz & cols. (1975) identificaram um FGF ácido (pI 5 - 6) pela sua capacidade em causar a proliferação e a diferenciação retardada de mioblastos. Thomas & cols. (1980), independentemente, detectaram a presença de um polipeptídeo em extratos de cérebro bovino que foi denominado FGF ácido. Mostrou-se que os FGFs ácido (a) e básico (b) eram potentes mitogênicos para células endoteliais e que se ligavam fortemente à heparina (Gospodarowicz & cols., 1987a; Burgess & Maciag, 1989).

Antes da elucidação da estrutura primária dos FGFs, muitos laboratórios isolaram-nos a partir de vários tecidos, órgãos e culturas de células e identificaram-nos sob diferentes nomes (acima de 30), dependendo da origem ou células alvo. Atualmente, sabe-se que a maioria destes fatores de crescimento correspondem

ao bFGF ou ao aFGF (Gospodarowicz & cols., 1987a; Burgess & Maciag, 1989; Baird & Klagsbrun, 1991).

A caracterização estrutural demonstrou que o bFGF e o aFGF são relacionados e servem como protótipos de uma família de fatores de crescimento que inclui, pelo menos, cinco outros membros: a proteína codificada pelo oncogene int-2; os produtos dos oncogenes humanos FGF-5 e hst/K-fgf; o produto de um gene isolado por homologia a hst/K-fgf (FGF-6/Hst-2); e o "keratinocyte growth factor" (KGF) (Burgess & Maciag, 1989; Thompson & cols., 1991; Baird & Klagsbrun, 1991).

1.2. Atividades dos FGFs

Os FGFs ácido e básico são multifuncionais, uma vez que eles podem tanto estimular a proliferação como induzir ou retardar a diferenciação celular. O mecanismo molecular da ação desses FGFs não é conhecido até o presente. Entretanto, novas e variadas funções têm sido descritas para os dois fatores de crescimento (Gospodarowicz & cols., 1987a; Burgess & Maciag, 1989).

Os dois FGFs são potentes proteínas mitogênicas capazes de induzir a divisão celular em uma grande variedade de tipos celulares (Gospodarowicz & cols., 1987a; Burgess & Maciag, 1989). Eles têm atividade angiogênica *in vivo* e *in vitro*. Em células endoteliais em cultura, os dois FGFs induzem a complexa resposta angiogênica (Squires & cols., 1988; Watanabe & cols., 1990), que abrange um aumento na proliferação celular, motilidade e produção de proteases (Moscatelli & cols., 1986; Presta & cols., 1986; Knoerzer & cols., 1989). Um efeito pronunciado dos aFGF e bFGF, o de manter neurônios viáveis e diferenciados em cultura, mostra que eles são fatores neurotróficos (Gospodarowicz & cols., 1987a). Células PC12 derivadas de feocromocitoma, usadas como modelo de diferenciação neuronal, quando incubadas com estes fatores formam neuritos (Togari & cols., 1983).

Em adição ao seu papel como ativador mitogênico ou fator de crescimento, mostrou-se que o bFGF tem algumas atividades não

mitogênicas. Baird & cols. (1985) mostraram seu papel regulatório na secreção de tirotrópina e prolactina. Sporn & Roberts (1988) relataram que o FGF tem efeito inibitório sobre células de sarcoma de Ewing e outras células tumorais. Plata-Salaman (1988) relatou que a injeção intraventricular do bFGF no cérebro de ratos suprime a absorção de alimentos. Okumura & cols. (1991) demonstraram que, injetando-se bFGF intracisternalmente, este inibe a secreção gástrica de modo dose-dependente. Estes dois dados sugerem que o bFGF pode ter um papel neuromodulador em várias funções do SNC.

1.3. Estrutura primária dos FGFs ácido e básico

Os FGFs ácido e básico são moléculas relacionadas e com propriedades similares. Eles diferem entretanto em algumas de suas propriedades físicas e químicas e na distribuição tecidual. Enquanto o aFGF é encontrado principalmente no cérebro e retina, o bFGF tem uma distribuição mais ampla, sendo encontrado, por exemplo, em hipófise, cérebro, adrenal, ovário, rim, macrófago, retina, próstata, fígado e condrossarcoma (Gospodarowicz & cols., 1987a; Burgess & Maciag, 1989).

1.3.1. Estrutura primária do bFGF

A sequência de aminoácidos do bFGF bovino, purificado como um polipeptídeo de cadeia única, composta de 146 aminoácidos (\sim 15 - 16 KDa), de pI 9-10, foi primeiramente descrita por Esch & cols. (1985).

Com o isolamento de clones de cDNAs codificando para os bFGFs bovino e humano (Abraham & cols., 1986a, 1986b), pode-se deduzir que muito provavelmente o produto primário de tradução é uma proteína de 155 aminoácidos (Figura 1), uma vez que encontrou-se um ATG na porção 5' do gene que estava em fase com os codons subsequentes no bFGF. Experimentos posteriores

demonstraram que esta proteína, cuja extremidade N-terminal estava bloqueada (acetilada), poderia ser obtida a partir de hipófises na presença de inibidores de proteases durante o isolamento e purificação da proteína (Ueno & cols., 1986). Estas observações indicam que a forma de bFGF de 146 aminoácidos e outras formas menores (Gospodarowicz & cols., 1985; Gospodarowicz & cols., 1986; Klagsbrun & cols., 1987; Ho & cols., 1988) são geradas durante a purificação através de proteólise da porção N-terminal (Klagsbrun & cols., 1987; Ho & cols., 1990), enquanto a forma de 155 resíduos representaria a verdadeira forma nativa da proteína (Thompson & cols., 1991). Outros autores (Florkiewicz & Sommer, 1989; Prats & cols., 1989) apresentaram evidências da existência de formas maiores de bFGF humano originadas através da tradução a partir de codons CTG (leucina) nas posições -41, -46 e -55 em relação ao ATG inicialmente proposto. Estes experimentos indicaram ainda que o início da tradução poderia ocorrer também no ATG proposto inicialmente, originando portanto, quatro produtos possíveis de tradução primária para a proteína humana, contendo, respectivamente, 155, 196, 201 ou 210 resíduos de aminoácidos.

```

ATG GCC GCC GGG AGC ATC ACC ACG CTG CCA GCC CTG CCG GAG GAC GGC
M  A  A  G  S  I  T  T  L  P  A  L  P  E  D  G
1                                     10

GGC AGC GGC GCT TTC CCG CCG GGC CAC TTC AAG GAC CCC AAG CGG CTG
G  S  G  A  F  P  P  G  H  F  K  D  P  K  R  L
20                                     30

TAC TGC AAG AAC GGG GGC TTC TTC CTG CGC ATC CAC CCC GAC GGC CGA
Y  C  K  N  G  G  F  F  L  R  I  H  P  D  G  R
40

GTG GAC GGG GTC CGC GAG AAG AGC GAC CCA CAC ATC AAA CTA CAA CTT
V  D  G  V  R  E  K  S  D  P  H  I  K  L  Q  L
50                                     60

CAA GCA GAA GAG AGA GGG GTT GTG TCT ATC AAA GGA GTG TGT GCA AAC
Q  A  E  E  R  G  V  V  S  I  K  G  V  C  A  N
70                                     80

CGT TAC CTT GCT ATG AAA GAA GAT GGA AGA TTA CTA GCT TCT AAA TGT
R  Y  L  A  M  K  E  D  G  R  L  L  A  S  K  C
90

GTT ACA GAC GAG TGT TTC TTT TTT GAA CGA TTG GAG TCT AAT AAC TAC
V  T  D  E  C  F  F  F  E  R  L  E  S  N  N  Y
100                                    110

AAT ACT TAC CGG TCA AGG AAA TAC TCC AGT TGG TAT GTG GCA CTG AAA
N  T  Y  R  S  R  K  Y  S  S  W  Y  V  A  L  K
120

CGA ACT GGG CAG TAT AAA CTT GGA CCC AAA ACA GGA CCT GGG CAG AAA
R  T  G  Q  Y  K  L  G  P  K  T  G  P  G  Q  K
130                                    140

GCT ATA CTT TTT CTT CCA ATG TCT GCT AAG AGC TGA
A  I  L  F  L  P  M  S  A  K  S  *
150

```

Figura 1. Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da região codificadora do cDNA do bFGF bovino (Abraham & cols., 1986a).

1.3.2. Estrutura primária do aFGF

A sequência de aminoácidos do aFGF bovino de 140 resíduos [15-154] foi primeiramente descrita por Gimenez-Gallego & cols. (1985). O aFGF foi purificado como um polipeptídeo de cadeia única, de pI 5-6 e cerca de 16 KDa. Formas truncadas na região N-terminal também foram descritas (Burgess & cols., 1986; Mckeehan & Crabb, 1987). As sequências completas dos aFGF humano [1-155] (Crabb & cols., 1986 e Jaye & cols., 1986) e bovino (Burgess & cols., 1986) foram elucidadas. A análise da sequência dos nucleotídeos do cDNA de aFGF humano demonstra que a região codificadora corresponde a uma proteína de 155 resíduos de aminoácidos (Figura 2), não havendo outros codons de iniciação alternativos na extremidade 5'. Além disso, há um codon de terminação (TGA) na posição -6 em relação ao ATG inicial proposto (Jaye & cols., 1986).

```

ATG GCT GAA GGG GAA ATC ACC ACC TTC ACA GCC CTG ACC GAG AAG TTT
M  A  E  G  E  I  T  T  F  T  A  L  T  E  K  F
1
10
AAT CTG CCT CCA GGG AAT TAC AAG AAG CCC AAA CTC CTC TAC TGT AGC
N  L  P  P  G  N  Y  K  K  P  K  L  L  Y  C  S
20
30
AAC GGG GGC CAC TTC CTG AGG ATC CTT CCG GAT GGC ACA GTG GAT GGG
N  G  G  H  F  L  R  I  L  P  D  G  T  V  D  G
40
ACA AGG GAC AGG AGC GAC CAG CAC ATT CAG CTG CAG CTC AGT GCG GAA
T  R  D  R  S  D  Q  H  I  Q  L  Q  L  S  A  E
50
60
AGC GTG GGG GAG GTG TAT ATA AAG AGT ACC GAG ACT GGC CAG TAC TTG
S  V  G  E  V  Y  I  K  S  T  E  T  G  Q  Y  L
70
80
GCC ATG GAC ACC GAC GGG CTT TTA TAC GGC TCA CAG ACA CCA AAT GAG
A  M  D  T  D  G  L  L  Y  G  S  Q  T  P  N  E
90
GAA TGT TTG TTC CTG GAA AGG CTG GAG GAG AAC CAT TAC AAC ACC TAT
E  C  L  F  L  E  R  L  E  E  N  H  Y  N  T  Y
100
110
ATA TCC AAG AAG CAT GCA GAG AAG AAT TGG TTT GTT GGC CTC AAG AAG
I  S  K  K  H  A  E  K  N  W  F  V  G  L  K  K
120
AAT GGG AGC TGC AAA CGC GGT CCT CGG ACT CAC TAT GGC CAG AAA GCA
N  G  S  C  K  R  G  P  R  T  H  Y  G  Q  K  A
130
140
ATC TTG TTT CTC CCC CTG CCA GTC TCT TCT GAT TAA
I  L  F  L  P  L  P  V  S  S  D  *
150

```

Figura 2. Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da região codificadora do cDNA de aFGF humano (Jaye & cols., 1986).

1.3.3. Análise das estruturas dos FGFs

A análise dos genes clonados, assim como das proteínas extraídas de tecidos, revela uma homologia de sequência de aminoácidos da ordem de 50% entre estas duas classes de proteínas (aFGF e bFGF).

As duas proteínas têm grande afinidade por heparina. Devido a esta característica, o aFGF e o bFGF foram também chamados, respectivamente, de "heparin-binding growth factors" 1 e 2 (HBGF-1 e HBGF-2) (Burgess & Maciag, 1989). Existem dois domínios potenciais de ligação à heparina, um localizado na região N-terminal e outro na região C-terminal: para o bFGF, resíduos 18-22 e 107-110 e para o aFGF, resíduos 9-12 e 100-102 (Gospodarowicz & cols., 1987a, 1987b). Evidências químicas e biológicas mais recentes sugerem que o domínio de ligação à heparina do bFGF pode ser uma estrutura tridimensional que envolve regiões não contíguas da molécula (Baird & Klagsbrun, 1991). Sabe-se que a heparina pode induzir a exposição de epítomos imunologicamente sensíveis no aFGF e protege os dois fatores de inativação por calor e por ácido, e de ataques proteolíticos (Burgess & Maciag, 1989). A heparina é particularmente importante na modulação da atividade do aFGF, potenciando sua atividade mitogênica, aparentemente prolongando a vida média do fator no meio de cultura. Não há efeito sinérgico comparável da heparina sobre o bFGF, que entretanto age como uma "molécula transportadora" deste fator, aumentando grandemente seu raio de ação (Burgess & Maciag, 1989; Baird & Klagsbrun, 1991).

Os produtos de tradução primária dos dois fatores de crescimento não são glicosilados nem têm peptídeo sinal clássico para secreção, embora existam receptores de superfície celular para estas proteínas (Burgess & Maciag, 1989; Thompson & cols., 1991). Por outro lado, o aFGF tem sequência de translocação nuclear (NYKKPKL - Figura 2) (Imamura & cols., 1990).

O bFGF manteve-se bem conservado através da evolução. Por exemplo, os bFGFs bovino (b) e humano (h) diferem em somente 2

aminoácidos. Para transformar o bbFGF em hbFGF, basta mutar o resíduo 121 de serina para treonina e o resíduo 137 de prolina para serina (Abraham & cols., 1986a). O mesmo não ocorreu com o aFGF; a forma bovina difere da humana em 11 resíduos (Gospodarowicz & cols., 1987b).

1.4. Organização dos genes

O alto grau de homologia entre aFGF e bFGF sugere que eles sejam derivados de um gene ancestral comum (Gospodarowicz & cols., 1987b). Os genes dos FGFs foram clonados e as sequências dos DNAs complementares (cDNAs) foram sintetizados: aFGF humano por Jaye & cols. (1986), bFGF humano por Abraham & cols. (1986b) e Kurokawa & cols. (1987), e bFGF bovino por Abraham & cols. (1986a).

As sequências de aminoácidos preditas através dos cDNAs coincidem com as estruturas determinadas pelas análises das sequências das proteínas extraídas de tecidos (Burgess & Maciag, 1989).

As duas proteínas são codificadas por genes separados, cada um deles representado no genoma por uma única cópia (Jaye & cols., 1986; Abraham & cols., 1986a, 1986b). A análise da localização cromossomal demonstra que o gene para aFGF humano está no cromossomo 5 entre as bandas 5q31.3 e 5q33.2 (Jaye & cols., 1986), enquanto o gene para bFGF humano está localizado no cromossomo 4 (Mergia & cols., 1986) na banda 4q25 (Fukushima & cols., 1990). Isto sugere que através do processo de duplicação gênica e divergência evolucionária, as duas proteínas tornaram-se produtos gênicos separados (Gospodarowicz & cols., 1987b).

Ambos os genes contém três exons separados por dois introns relativamente grandes. O mapeamento por enzimas de restrição de ambos os genes indica que seus tamanhos são maiores que 38 Kb (Gospodarowicz & cols., 1987b; Burgess & Maciag, 1989).

Em várias culturas de células e tecidos, o gene de bFGF transcreve duas espécies de mRNAs poliadenilados de

aproximadamente 3,7 e 7,0 Kb. O gene de aFGF parece codificar uma única espécie de mRNA de aproximadamente 4,6 Kb (Gospodarowicz & cols., 1987b).

1.5. Expressão dos FGFs recombinantes

FGF recombinante tem sido expresso em células de mamífero (Abraham & cols., 1986c; Kurokawa & cols., 1987; Rogelj & cols., 1988; Sasada & cols., 1988; Blam & cols., 1988; Neufeld & cols., 1988; Jaye & cols., 1988; Prats & cols., 1989; Florkiewicz & Sommer, 1989); S. cerevisiae (Barr & cols., 1988) e E. coli (Iwane & cols., 1987; Jaye & cols., 1987; Linemeyer & cols., 1987; Barr & cols., 1988; Squires & cols., 1988; Fox & cols., 1988; Knoerzer & cols., 1989; Seno & cols., 1990; Watanabe & cols., 1990; Ke & cols., 1990; Thompson & cols., 1991). Os protocolos de expressão, assim como os objetivos, são variados.

E. coli tem sido o organismo preferido quando o objetivo é a produção em larga escala das proteínas modificadas ou não por engenharia genética, uma vez que os FGFs são polipeptídeos de cadeia única, não são glicosilados e não apresentam ligações dissulfeto estáveis.

Os trabalhos descrevem, em geral, que os FGFs são produtos de baixa (ou nenhuma) toxicidade e que podem ser obtidos em grande parte como proteínas solúveis intracelulares. A produção em escala laboratorial varia com o sistema de expressão utilizado, a forma molecular que está sendo expressa e com a modificação da sequência gênica codificadora nativa. Os melhores resultados obtidos (10-50 mg de FGF por litro de cultura induzida) foram aqueles onde se utilizaram promotores fortes (trp, T7 RNA polimerase), sequências líder altamente expressas e/ou sequências gênicas modificadas (Iwane & cols., 1987; Jaye & cols., 1987; Squires & cols., 1988; Watanabe & cols., 1990; Ke & cols., 1990; Thompson & cols., 1991).

1.6. Objetivos

Atualmente, há grande interesse em se estudar os mecanismos de ação dos FGFs a nível molecular assim como definir seus papéis *in vivo*. Uma das metas do laboratório é estudar esses aspectos através de proteínas modificadas por manipulação genética.

A primeira etapa, objetivo deste trabalho, foi o desenvolvimento de sistemas adequados para a expressão de dois componentes da família dos FGFs: o bFGF bovino (bbFGF, pI 9-10) e o aFGF humano (haFGF, pI 5-6), através de técnicas de DNA recombinante. Essa proposição foi subdividida em três fases: (1) construção dos vetores de expressão contendo as sequências gênicas adequadas; (2) produção de FGF em escala laboratorial e (3) purificação e caracterização química e biológica dos produtos obtidos.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Vetores - (1) pJC3-5 - contém um fragmento de 475 pares de bases (bp), incluindo a região que codifica para o haFGF, inserido nos sítios de NcoI e EcoRI do plasmídeo pBR329 (Covarrubias, & Bolivar, 1982). A sequência deste fragmento corresponde àquela descrita por Jaye & cols. (1986), com as seguintes modificações: (a) alteração em um sítio de NcoI sem afetar os codons; (b) o codon de terminação foi trocado de TAA para TGA e (c) dois novos sítios de clivagem para as enzimas HindIII e EcoRI foram adicionados em seguida ao codon de terminação; (2) pJJ11-1 - contém um fragmento de 1,4 Kilobases (Kb) constituído pelo cDNA do gene de bbFGF, cuja sequência foi descrita anteriormente (Abraham & cols., 1986a). Este fragmento está inserido no sítio de EcoRI do plasmídeo pBR322 (Bolivar & cols., 1977). Estes dois plasmídeos foram cedidos pela Dra. J. A. Abraham (California Biotechnology, Inc., CA, USA). Um esquema dos fragmentos contidos nos plasmídeos pJJ11-1 e pJC3-5 está mostrado na Figura 3; (3) pKK233-2 (Pharmacia LKB Biotechnology) - plasmídeo de expressão onde as sequências gênicas ficam sob controle do promotor trc (Amann & Brosius, 1985) - Figura 4.a.; (4) pET-3d (cedido pelo Dr. Fernando de Castro Reinach com a autorização do Dr. F. W. Studier - Brookhaven National Lab., NY, USA) - um dos vetores pET (plasmídeo para Expressão pela I7 RNA polimerase; Studier & cols., 1990) - Figura 4.b.; (5) pUC19 (Yanisch-Perron & cols., 1985) cedido pela Dra. Martha H. Sonobe.

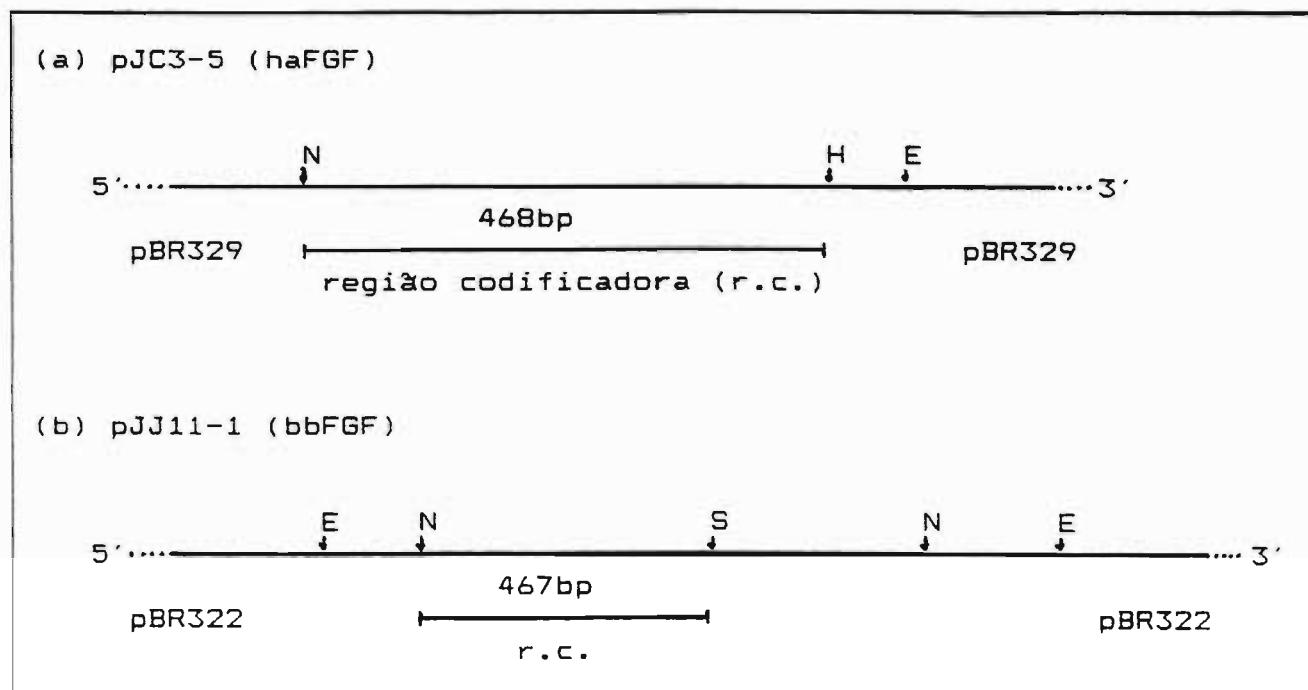


Figura 3. Esquema dos fragmentos de DNA de haFGF e de bbFGF inseridos em pJC3-5 e pJJ11-1 respectivamente. (a) pJC3-5 - haFGF+pBR329 e (b) pJJ11-1 - bbFGF+pBR322. N (NcoI); H (HindIII); E (EcoRI); S (Sau3AI)

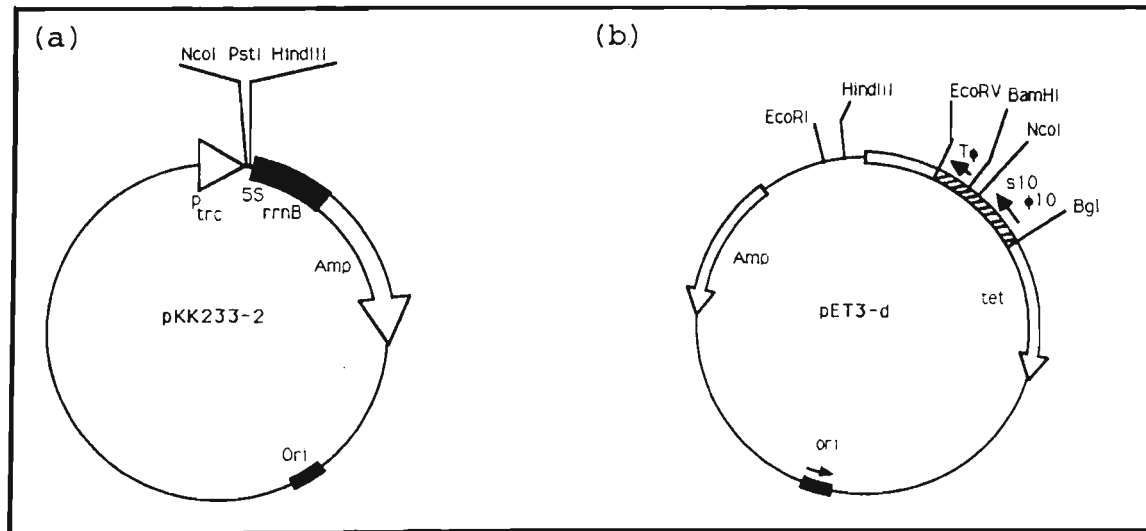


Figura 4. Plasmídeos de expressão utilizados. (a) pKK233-2 - vetor do tipo ATG (Amann & Brosius, - 1985) derivado de pBR322. Elementos principais: (1) P_{trc} - promotor híbrido entre os promotores *trp* e *lac*; (2) RBS, sítio de ligação ao ribossomo do gene *lac Z*; (3) MCS - sítio múltiplo de clonagem; (4) *rrnB* - terminador de transcrição; (5) *Amp^r* - gene que confere resistência a ampicilina. (b) pET-3d - um dos vetores pET (Studier & cols., 1990). Principais elementos: (1) *Amp^r* - confere resistência a ampicilina; (2) $\phi 10$ -S10 - contém um promotor para a T7 RNA polimerase derivado do promotor $\phi 10$ ligado à região de iniciação da tradução da proteína do gene *10*; (3) "ATG cloning site" (*NcoI*); (4) "fusion cloning site" (*BamHI*) (5) $T\phi$ - terminador de transcrição.

2.2. Hospedeiros - (1) E. coli cepa HB101 - usada como recipiente em transformação e para preparações em larga escala de plasmídeos (Maniatis & cols., 1982); (2) E. coli K12 cepa JM105 - usada como recipiente em transformação por pKK233-2 e pUC19 (Yanisch-Perron & cols., 1985); (3) E. coli K12 cepa HMS174 (F^- $recA^-$ r^{-} $\kappa_{12}m^{+}\kappa_{12}Rif^R$) - usada como hospedeiro para clonagem inicial do DNA de interesse em vetores pET e para manutenção dos plasmídeos (Studier & cols., 1990); (4) E. coli B cepa BL21 (F^- $ompT^-$ lon^-) - usada como hospedeiro de expressão, apresenta a vantagem de ser uma cepa B, que é deficiente na protease lon. Também não tem ompT, protease de membrana externa que pode degradar proteínas durante a purificação (Studier & cols., 1990).

2.3. Transformação de *E. coli* com DNA plasmidial (Mandel & Higa, 1970)

Culturas de E. coli foram preparadas em meio LB (Luria-Bertani) até atingir $A_{600} \approx 0,3$. As células foram coletadas por centrifugação (15 minutos, 5.000 rpm, 4° C), incubadas em 10 ml de acetato de sódio 10 mM pH 6,5 contendo $CaCl_2$ 0,1 M (30 minutos, 0° C) e novamente centrifugadas. Os precipitados resultantes foram ressuspensos separadamente, em solução de acetato de sódio/ $CaCl_2$ contendo 20% de glicerol. Aliquotas de 1 ml contendo as bactérias competentes foram congeladas em N_2 líquido e armazenadas a -70° C. Para a transformação, as bactérias foram descongeladas em banho de gelo por aproximadamente 30 minutos.

Para cada transformação tomou-se cerca de 500 ng de plasmídeos e misturou-se com 200 μ l da suspensão de bactérias competentes em um tubo que foi incubado sucessivamente em banho de gelo (30 minutos), a 37° C (5 minutos) e em banho de gelo (10 minutos). A seguir se adicionou 1,0 ml de meio LB aos tubos (suspensão 1) e a incubação prosseguiu a 37° C por mais 30 minutos.

Todas as bactérias utilizadas sofreram o mesmo processo de transformação, com exceção de E. coli JM105 que antes de ser cultivada para torná-la competente foi ressuspensa em meio LB, incubada por uma noite a 37° C, depois plaqueada em meio mínimo M-9 contendo 1 ug ml⁻¹ de tiamina e 25 ug ml⁻¹ de estreptomicina, e novamente incubada por uma noite a 37° C. Este tratamento foi realizado para assegurar a retenção de F' episossomal que é necessário para a infecção pelo fago M13 e a complementação da B-galactosidase (triagem azul/branca) (Yanisch-Perron & cols., 1985).

2.4. Extração de DNA plasmidial

Colônias crescidas em placas LBA (meio LB contendo 1,5% de ágar e antibiótico) foram inoculadas isoladamente em meio líquido LBA (7 ml) e incubadas por uma noite (37° C, sob agitação). Os inóculos gerados foram transferidos para frascos contendo 400 ml de meio LBA e incubados por uma noite (37° C, sob agitação). As bactérias foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm, 10 minutos, 4° C), ressuspensas e lavadas por centrifugação com 6 ml de tampão GET gelado (Glicose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0). Os precipitados finais foram ressuspensos em tampão GET gelado (4 ml, 0° C), tratados com lisozima (1 ml de solução 25 mg ml⁻¹ em tampão GET) por 5 minutos à temperatura ambiente e depois mantidos em gelo. A seguir, adicionou-se lentamente e sob agitação 10 ml da solução de lise (NaOH 0,2 N/SDS 1%) incubando-se por 10 minutos (0° C); seguiu-se a adição de acetato de potássio 3 M pH 4,8 gelado e nova incubação (0° C, 10 minutos) após o que as suspensões foram centrifugadas (15.000 rpm, 20 minutos, 4° C). Ao sobrenadante adicionou-se então 0,6 volume de isopropanol incubando-se por cerca de 2 horas a 22° C. Os precipitados foram coletados por centrifugação (25 minutos, 12.000 rpm, 4° C) e dissolvidos em 3 ml de TE pH 8,0 autoclavado previamente (TE=Tris-HCl 10 mM/EDTA 1mM pH 8,0). As suspensões resultantes foram tratadas com RNase A (tipo I - A, Sigma

Chemical Co.; 5 μ l de solução 10 mg ml⁻¹ em acetato de sódio 0,1 M, EDTA 0,3 M pH 4,8, pré-aquecida a 80° C por 10 minutos), por uma noite a 37° C e logo após com proteinase K (Merck; 5 μ l da suspensão 20 mg ml⁻¹ em água) por 5 horas a 37° C. As soluções foram desproteinizadas com igual volume de fenol-clorofórmio (mistura 1:1, 2 vezes), coletando-se a fase aquosa após centrifugação. As soluções finais (cerca de 3 ml cada uma) adicionou-se NaCl 5 M para concentração final de 0,2 M e o DNA foi precipitado com etanol (6,5 ml, -20° C, 12 horas). Os precipitados foram lavados com etanol 80%, coletados por centrifugação e finalmente secos sob vácuo.

2.5. Purificação do DNA plasmidial em CsCl

CsCl (1 g ml⁻¹, concentração final) foi adicionado às preparações de DNA (3 ml cada). As soluções resultantes foram transferidas para tubos de polialômero (Beckman). A cada tubo se adicionou 0,3 ml de brometo de etídio (40 mg ml⁻¹ em água). Os tubos foram equilibrados e centrifugados (65.000 rpm, 14 horas, 20° C, rotor VTI-80). As bandas correspondentes aos DNAs plasmidiais foram identificadas iluminando-se os tubos com lâmpada de luz ultra-violeta (UVS-12) e coletadas furando-se os tubos com agulhas (30X7) conectadas em seringas de 1 ml (Maniatis & cols., 1982). Os DNAs coletados (cerca de 1 ml para cada preparação) foram lavados com álcool isoamílico (1-2 ml cada vez) até extração total do brometo de etídio. Posteriormente as soluções aquosas foram dialisadas contra água bidestilada (3,5 litros, 2 vezes, 10 horas) e TE (3,5 litros, 2 vezes, 8 horas) em câmara fria. Finalmente os DNAs foram precipitados com 3 volumes de etanol (48 horas, -20° C), lavados uma vez por centrifugação com etanol 80% e solubilizados em 0,2 X TE.

2.6. Mini-preparações de plasmídeos (Holmes & Quigley, 1981)

Uma colônia de bactérias transformadas foi inoculada em 10 ml de meio LBA (ampicilina 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), incubada por uma noite, sob agitação a 37° C, esfriada a 4° C e centrifugada a 7.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspense em 700 μl de tampão STET (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; Sacarose 8%; Triton X-100 5%). A suspensão foi transferida para outro tubo "Eppendorf" e lisozima foi adicionada (5 μl da solução a 5 mg ml^{-1} em glicose 50 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0 recém-preparada). O tubo foi então incubado por 90 segundos em banho de água fervente e centrifugado a 12.000 g por 20 minutos à temperatura ambiente; o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Adicionaram-se 5 μl de RNase A (acima mencionada) e incubou-se à temperatura ambiente por 15 minutos. A amostra foi desproteïnizada por duas vezes, uma com a mistura fenol-clorofórmio (1:1) e outra com clorofórmio. A fase aquosa resultante, adicionou-se 0,2 volume de acetato de amônio 10 M e 2 volumes de etanol 100% a 4° C. A amostra foi incubada a -20° C por 12 horas; centrifugou-se a 12.000 g por 20 minutos à temperatura ambiente, e o precipitado de DNA foi lavado com etanol 80%, seco sob vácuo e ressuspense em 50 μl de água.

2.7. Eletroforese em gel de agarose

As preparações de DNAs plasmidiais foram analisadas por eletroforese em mini-gel (5,5 cm X 7,5 cm) ou em gel (11 cm X 13 cm) de agarose preparados a partir de agarose 1% dissolvida em tampão 0,5 X TBE (ou 1 X TBE) (1 X = Tris-borato 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA 0,002 M pH 8,0), contendo brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; Maniatis & cols., 1982). DNAs de fago λ digeridos com BstEII foram utilizados como padrão. As eletroforeses foram realizadas em tampão 0,5 X TBE (ou 1 X TBE), a 60 V; 40 mA, à

temperatura ambiente. As corridas foram seguidas pela migração dos corantes azul de bromofenol e xilenocianol.

As bandas de DNA foram visualizadas por trans-iluminação com lâmpada UV e fotografadas usando filme Copex Pan (Kodak).

2.8. Recuperação de fragmentos de DNA através de eletroforese sobre membrana de DEAE-celulose (Sambrook & cols., 1989)

Uma quantidade de DNA que originava pelo menos 100 ng do fragmento de interesse foi digerida e separada por eletroforese em gel de agarose 1% (8,5 cm X 13,0 cm) contendo 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de brometo de etídio. A banda de interesse foi então localizada com o auxílio de uma lâmpada UV (UVS-12 MINERALIGHT[®]). Uma incisão no gel em frente à banda foi feita, usando-se uma lâmina. A membrana de DEAE-celulose (Schleicher & Schull NA-45), tratada previamente com EDTA 10 mM pH 8,0, NaOH 0,5 N e lavada com água estéril, foi inserida com auxílio de uma pinça. A eletroforese foi reiniciada (5 V cm^{-1}) até que a banda do DNA tivesse migrado sobre a membrana. A progressão da banda foi monitorada com o auxílio da lâmpada UV. A membrana foi retirada do gel e lavada rapidamente com 5-10 ml de tampão de lavagem de baixa concentração salina (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 0,15 M; EDTA 10 mM pH 8,0) à temperatura ambiente (este tratamento remove parte da agarose da membrana). A membrana foi então transferida para um tubo "Eppendorf". Tampão de eluição de concentração salina alta (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 1 M; EDTA 10 mM pH 8,0) foi adicionado até cobrir completamente a membrana. Esta foi cuidadosamente dobrada dentro do tubo, que foi fechado e incubado a 65° C por 30 minutos. O líquido foi transferido para um outro tubo e a membrana foi incubada (65° C, 15 minutos) com uma segunda alíquota de tampão de eluição. As duas alíquotas foram reunidas e tratadas uma vez com fenol-clorofórmio (mistura 1:1); a fase aquosa foi transferida para outro tubo, adicionando-se 0,2 volume de acetato de amônio 10 M e 2 volumes de etanol gelado. Incubou-se a mistura por 1 hora a -70° C e recuperou-se o DNA por

centrifugação (12.000 g; 20 minutos) em câmara fria. Cuidadosamente, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 80% gelado, seco sob vácuo e dissolvido em 5 ul de água.

2.9. Reação de ligase

Os DNAs do vetor e do fragmento (ver 2.12) foram adicionados a um tubo estéril. O volume final foi completado para 8 ul com água. A mistura foi incubada a 45° C por 5 minutos, para fundir formas reaneladas que eventualmente tenham se formado, e resfriada a 0° C. Adicionou-se a seguir 1 ul de tampão de enzima 10 vezes concentrado (Maniatis & cols., 1982), mais 1 ul da enzima T4 DNA ligase (1.000 U ml⁻¹). A reação prosseguiu por uma noite à temperatura ambiente.

2.10. Dessalinização de oligonucleotídeos sintéticos: cromatografia de gel-filtração em coluna de Sephadex G-25 DNA

Quatro oligonucleotídeos, com cerca de 30 bases cada um, foram sintetizados por Wilton J. R. Lima no laboratório do Dr. Hamza El-Dorry. Estes nucleotídeos, correspondiam à extremidade 5' da região codificadora de bbFGF, foram usados para substituir cerca de 60 pares de bases do cDNA nativo.

Houve necessidade de dessalinizar os oligonucleotídeos. Estes então foram ressuspensos isoladamente em 400 ul de água Milli-Q e adicionados em colunas contendo resina Sephadex G25-DNA fina (Pharmacia LKB Biotechnology, 1,1 cm X 4,5 cm - 5,0 ml), previamente autoclavada e equilibrada com água Milli-Q. A seguir, as colunas foram lavadas 10 vezes com 400 ul de água Milli-Q por vez, coletando-se todas as amostras eluídas em cada lavagem. Os oligonucleotídeos foram eluídos nas lavagens de nº 6 e 7.

Todo o processo de dessalinização foi realizado à temperatura ambiente.

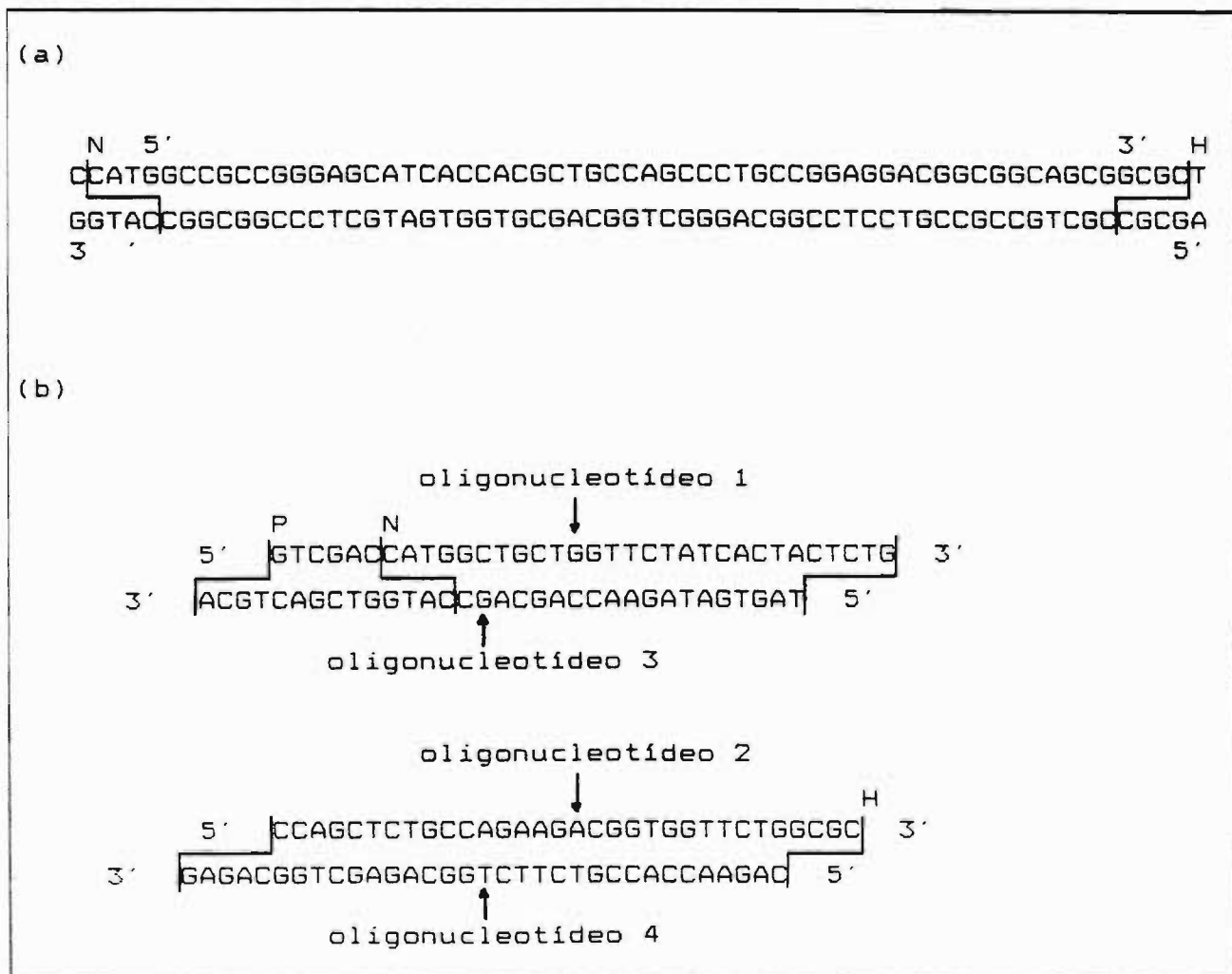


Figura 5. (a) Extremidade 5' da região codificadora nativa de bbFGF que foi substituída pelos 4 oligonucleotídeos sintéticos; (b) Desenho dos 4 oligonucleotídeos que foram sintetizados para substituir a extremidade 5' da região codificadora nativa de bbFGF. P (PstI); N (NcoI); H (HaeII)

2.11. Hibridização e fosforilação dos oligonucleotídeos

Como mostra a Figura 5.b, houve necessidade de hibridizar o oligonucleotídeo 1 com o 3 e o 2 com o 4, para substituir a extremidade 5' da região codificadora nativa do bbFGF (Figura 5.a). Para tanto, foram misturadas quantidades equimolares dos oligonucleotídeos correspondentes (120 uM), que foram aquecidas a 80° C num becker e esfriadas até a temperatura ambiente. Estes fragmentos de DNA de dupla fita assim formado foram denominados oligonucleotídeo (1+3) e oligonucleotídeo (2+4). Em uma das extremidades do oligonucleotídeo (1+3) formou-se um sítio de restrição para PstI; a outra é coesiva com uma das extremidades do oligonucleotídeo (2+4). Uma das extremidades do oligonucleotídeo (2+4) tem um sítio de clivagem para HaeII (Figura 5.b).

Após a hibridização, as extremidades 5' das duplas fitas formadas foram fosforiladas. Adicionaram-se, respectivamente, a tubos estéreis: 2 ul de oligonucleotídeos (120 pmols), 2 ul de tampão quinase 10 X concentrado, 1 ul de DTT 100 mM, 1 ul de ATP 10 mM, 12 ul de água bidestilada, 1 ul de polinucleotideoquinase (Biolabs) 10 U ul⁻¹. A reação ocorreu a 37° C por 1 hora. A enzima foi então inativada (65°C, 10 minutos) (Carter, 1987).

2.12. Estratégias utilizadas para subclonagens

2.12.1. Subclonagem de haFGF em pKK233-2

(1) o fragmento de DNA de haFGF (468 bp), retirado de pJC3-5 (Figura 3.a) através de digestão com NcoI e HindIII, foi recuperado conforme descrito em 2.8; (2) o vetor pKK233-2 foi também digerido com as mesmas enzimas; (3) o fragmento de haFGF e o vetor pKK233-2, digeridos com NcoI e HindIII, foram ligados através de suas extremidades coesivas com a enzima T4 DNA ligase, conforme descrito em 2.9.

A proporção vetor:inserir utilizado nesta subclonagem foi de 1:10. Na proporção usualmente recomendada (1 de vetor:1 de fragmento) não foram obtidos transformantes (Sambrook & cols., 1989).

2.12.2. Subclonagem de haFGF em pET-3d

(1) igual item (1) de 2.12.1; (2) o vetor pET-3d foi digerido com NcoI e HindIII, liberando um fragmento de tamanho (PM) semelhante ao do insero (haFGF) (Figura 6); (3) o "vetor" pET-3d (NcoI-HindIII) foi isolado do fragmento menor, conforme descrito em 2.8; (4) o fragmento de haFGF e o "vetor" pET-3d foram ligados através de suas extremidades coesivas com a enzima T4 DNA ligase, conforme mostrado em 2.9.

As proporções vetor:inserir utilizadas nesta reação de ligação foram: (a) 1:1; (b) 1:3; e (c) 1:5 (Tabela V).

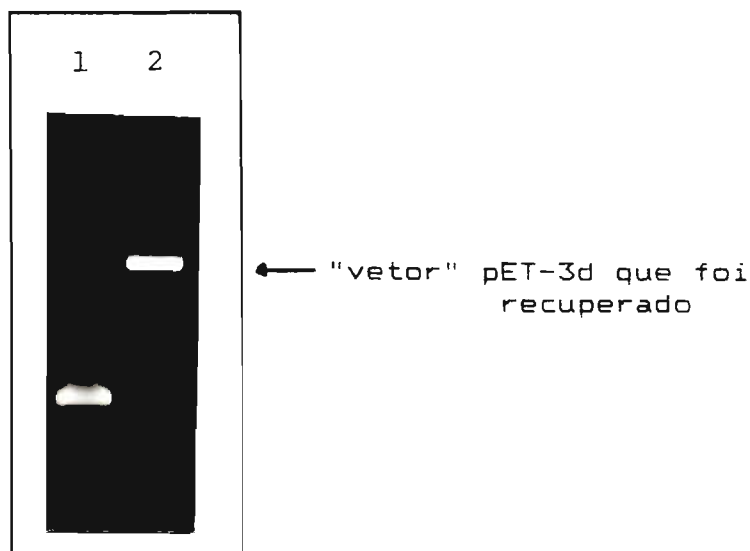


Figura 6. Eletroforese de pET-3d e do fragmento de haFGF após digestão com NcoI-HindIII. Poço 1 - haFGF (NcoI-HindIII); Poço 2 - pET-3d (NcoI-HindIII). Foi aplicado 1 ul de cada amostra.

2.12.3. Subclonagem de bbFGF em pET-3d

(1) O fragmento de DNA de bbFGF de 1,4 Kb (Figura 7), retirado de pJJ11-1 através de digestão com EcoRI, foi recuperado conforme descrito em 2.8 - fragmento EcoRI-EcoRI; (2) Este fragmento foi digerido com HaeII, recuperando-se o fragmento de 1,2 Kb pelo mesmo método - fragmento HaeII-EcoRI; o fragmento NcoI-HaeII (Figura 7) foi substituído pelos oligonucleotídeos (1+3) e (2+4) do item 2.11 (Figura 5.b); (3) O vetor pUC19 foi digerido com PstI e EcoRI; (4) A reação de ligase foi realizada juntando-se o fragmento HaeII-EcoRI (7,6 pmols), o oligonucleotídeo (1+3) fosforilado (7,8 pmols), o oligonucleotídeo (2+4) fosforilado (7,8 pmols) e o pUC19 digerido com PstI e EcoRI (2,8 pmols). Estes foram ligados através de suas extremidades coesivas com a enzima T4 DNA ligase, conforme mostrado em 2.9; (5) O novo plasmídeo assim formado (pUC19+bbFGFmodif. - denominado pAUXB-1) foi digerido com NcoI liberando um fragmento de aproximadamente 1,0 Kb - fragmento NcoI-NcoI, que foi recuperado pelo método acima mencionado; (6) Este fragmento foi digerido com Sau3AI, gerando 3 fragmentos: fragmento NcoI-Sau3AI (466 bp) contendo a sequência codificadora; fragmento Sau3AI-Sau3AI (19 bp) e fragmento Sau3AI-NcoI (561 bp); (7) O vetor pET-3d foi digerido com NcoI e BamHI; (8) A reação de ligase foi realizada misturando-se os fragmentos gerados em (6) com o vetor pET-3d (da etapa 7). Um esquema desta subclonagem está mostrado na Figura 8.

As proporções vetor:inserto utilizadas nesta reação de ligação foram: (a) 1:1; (b) 1:3; e (c) 1:5.

O bbFGFmodif. foi subclonado em pUC19 para posterior sequenciamento da porção de DNA modificada.

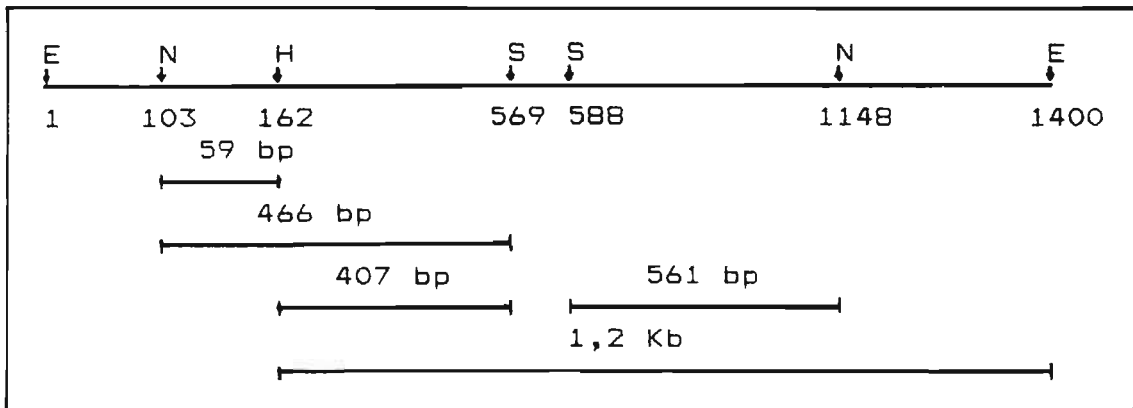


Figura 7. Principais sítios de restrição do cDNA nativo de bbFGF. Fragmento N-H (59 bp) - porção que foi substituída pelo DNA sintético (confira Figura 8); Fragmento N-S (466 bp) - região codificadora. E (EcoRI); N (NcoI); H (HaeII); S (Sau3AI).

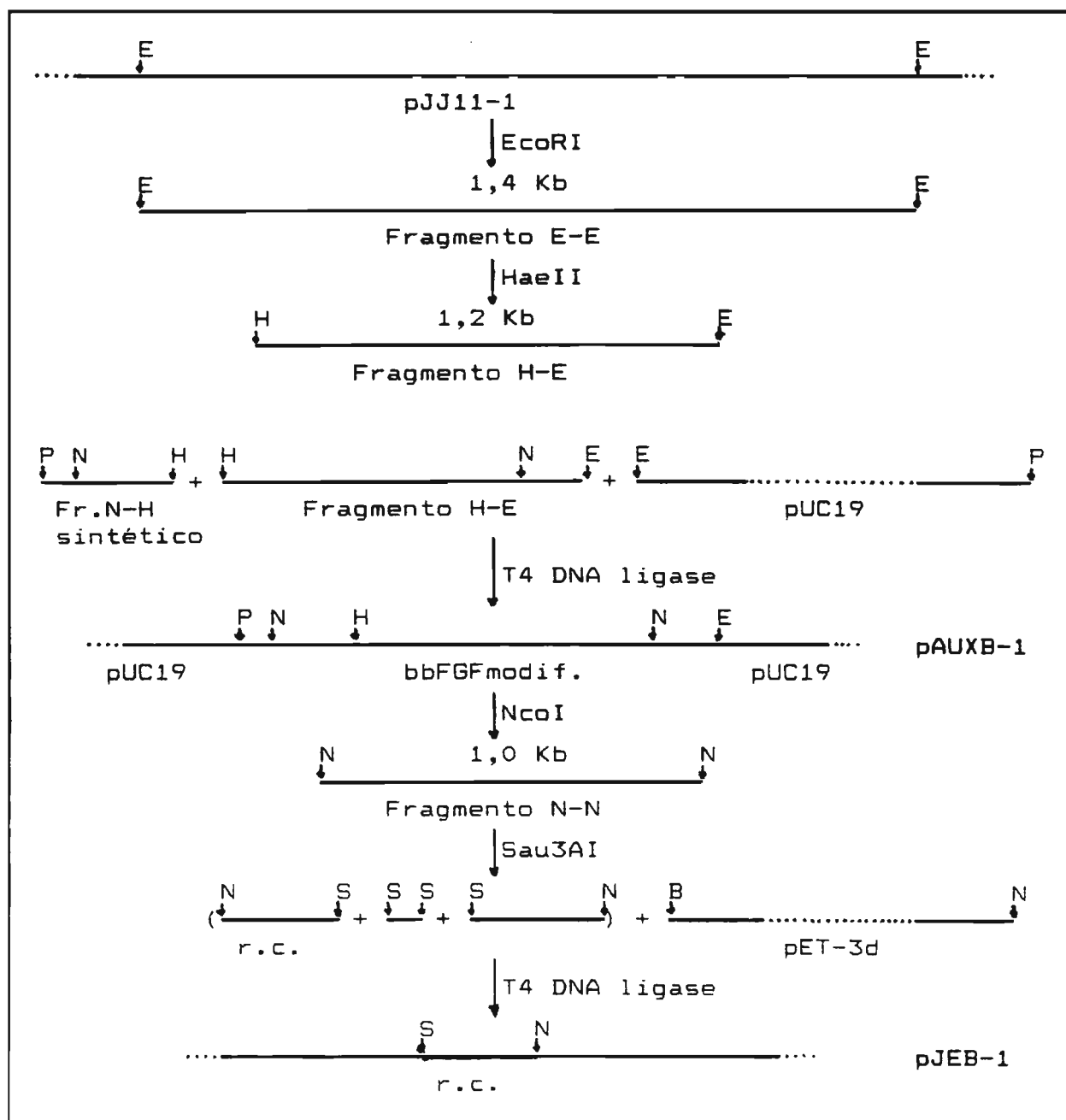


Figura 8. Esquema de subclonagem de bbFGF em pET-3d. Os sítios de restrição de BamHI e de Sau3AI são coesivos. E (EcoRI), H (HaeII), P (PstI), N (NcoI), S (Sau3AI), B (BamHI), r.c. (região codificadora).

2.13. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo (Sanger & cols., 1977).

Utilizando o vetor pAUXB-1, a extremidade 5' da região codificadora do cDNA modificado de bbFGF foi sequenciada utilizando-se o plasmídeo dupla fita. Primeiramente, o DNA plasmidial foi desnaturado conforme Lim & Pene (1988) e a seguir procedeu-se de acordo com o protocolo descrito no catálogo que acompanha o "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia LKB Biotechnology).

2.14. Eletroforese de sequenciamento de DNA

O gel foi montado em sistema de sequenciamento Bio-Rad SEQ-GEN, conforme especificações do fabricante. Para cada gel de 50 cm X 20 cm foram utilizados 50 ml de gel desnaturante (5% de mistura acrilamida-bisacrilamida (19:1), 1 X TBE e 21 g de uréia).

As placas foram fixadas utilizando espaçadores com espessura variando de 0,20 mm a 0,75 mm (do topo para a base do gel).

O gel foi colocado entre as placas presas e estas foram deixadas na posição horizontal por 45 minutos para polimerização. Após este período, o gel foi submetido a uma pré-corrida de 1 hora na potência de 40 W e a 50° C. Amostras de 2 ul de cada reação foram então aplicadas e a eletroforese prosseguiu por 2 horas nas mesmas condições da pré-corrida. O gel aderido a uma das placas foi então fixado em solução de ácido acético:metanol:água (1:1:8) por 20 minutos à temperatura ambiente, transferido para papel 3MM e coberto com uma película de plástico para secagem sob vácuo a 80° C. Depois de seco, o gel foi exposto contra filme de raio X (Kodak X-Omat).

2.15. SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

A eletroforese foi realizada num gel de separação 15% T e 2,67% C, de 5,0 cm de comprimento, a 20 mA e 45 V, por aproximadamente 2,5 horas à temperatura ambiente. O gel de empilhamento utilizado (1,0 cm de comprimento) tinha a composição de 3% T e 2,67% C.

2.16. Western-Blotting

A transferência das frações proteicas do gel de poliacrilamida-SDS para a membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schull BAB5 0,45 μ m) foi feita por aproximadamente 14 horas a 60 mA em câmara fria, em tampão de transferência (Tris-Base 10 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Logo após a transferência, a membrana com as frações proteicas foi corada com Ponceau S 0,1% em ácido acético 10% e fotografada.

A reação com anticorpos anti-aFGF foi feita como descrita abaixo: (1) Os sítios inespecíficos foram bloqueados, incubando-se a membrana com 0,3% de gelatina (Colágeno Tipo II de pele de porco - Sigma) em PBSA sob agitação (2 horas, temperatura ambiente); (2) O antisoro (anti-aFGF Y-34-A - doado pelo Dr. W. McKeehan - W. Alton Jones Cell Science Center, N.Y., USA) diluído a 1:250 (em PBSA; gelatina 0,3%) foi incubado por uma noite a 4° C e depois por 1 hora à temperatura ambiente; (3) Lavou-se com a solução de lavagem (gelatina 0,3%, Tween 20 (Riedel) 0,05% em PBSA) à temperatura ambiente, sob agitação, por 1 hora (4 trocas de solução); (4) Incubou-se com o conjugado fosfatase alcalina-IgG ("Anti-rabbit IgG", Sigma nº 8025) diluído em Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM (solução diluente) por 1 hora, sob agitação à temperatura ambiente; (5) Lavou-se com a solução de lavagem descrita acima por 1 hora (4 trocas, sob agitação). Para a revelação, a solução de lavagem foi removida totalmente, lavou-se novamente com a solução diluente e então adicionaram-se

33 μ l de BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-Fosfato) 50 mg ml⁻¹ e 66 μ l de NBT (Nitroblue Tetrazolium) 50 mg ml⁻¹ em 10 ml de diluente. A reação positiva originou bandas de cor azul-violeta após 10 minutos de incubação; (6) Finalmente a reação foi interrompida, lavando-se várias vezes com água.

2.17. Sistema de expressão usando vetor pKK (Amann & Brosius, 1985)

Estes vetores têm promotores de fusão trp-lac (trc) fortemente regulados e o sítio de ligação ao ribossomo (RBS) de lacZ seguido do codon de iniciação de tradução ATG, onde começa o sítio múltiplo de clonagem (MCS) (Figura 4.a).

O promotor trc tem espaçamento de 17 pares de bases entre a região -35 de trp e a região -10 de lacUV5. O codon de iniciação de tradução ATG está localizado em um único sítio de restrição NcoI. A região de clonagem é seguida por terminadores de transcrição rrnB.

Estes vetores podem ser utilizados em vários casos: (1) diretamente para gene em que o sítio NcoI coincide com seu codon de iniciação; (2) por ligação abrupta de fragmentos onde o sítio NcoI do vetor foi preenchido; (3) correção da fase de tradução por adição de ligantes NcoI de tamanho apropriado; (4) inserção de cDNA.

2.18. Sistema de expressão usando vetor pET (Studier & cols., 1990)

A RNA polimerase do bacteriófago T7 é bem seletiva para promotores específicos que raramente são encontrados em DNAs não relacionados ao DNA de T7. Sinais de terminação são também raros, de modo que a T7 RNA polimerase transcreve completa e eficientemente a maioria dos DNAs que é colocada sob controle do promotor T7. A T7 RNA polimerase é uma enzima muito ativa e alonga as cadeias cerca de cinco vezes mais rapidamente do que a

RNA polimerase de E. coli. Em alguns casos, a transcrição pela T7 RNA polimerase é tão intensa que a RNA polimerase bacteriana aparentemente não consegue competir. Sob circunstâncias favoráveis, os recursos da célula são dirigidos quase que inteiramente para a produção de RNAs a partir de promotores reconhecidos pela T7 RNA polimerase. Este sistema é capaz de expressar uma grande variedade de DNAs tanto de origem procariótica como eucariótica.

A bactéria E. coli BL21(DE3) é lisogênica para o fago DE3 (derivado de λ). Além da região de imunidade, ele carrega um fragmento de DNA contendo o gene *lacI*, o promotor *lacUV5*, o começo do gene *lacZ* e o gene para a T7 RNA polimerase. Este fragmento está inserido no gene *int*. Em E. coli BL21(DE3) o promotor *lacUV5*, induzível por IPTG (Isopropil B-D-tiogalactosídeo - Sigma), controla a transcrição do gene da T7 RNA polimerase que, por sua vez, transcreve o DNA de interesse inserido nos plasmídeos de expressão pET que são usados para transformar esta bactéria. Tais vetores foram construídos a partir de pBR322 onde o promotor T7 foi inserido no sítio BamHI em sentido anti-horário, oposto ao do promotor *tet*. Conferem resistência à ampicilina (Figura 4.b). Os vetores pET permitem expressar tanto o haFGF como o bbFGF a partir do ATG inicial, presente no cDNA, ou então como uma pequena proteína de fusão. A primeira alternativa foi a escolhida para ambas proteínas.

2.19. Indução da expressão de proteínas em E. coli

2.19.1. Indução da expressão de haFGF utilizando pKK233-2

Uma cultura de E. coli JM105 transformada com o vetor contendo o inserto de haFGF foi incubada em meio LBA (ampicilina 100 ug ml^{-1}) a 37° C com agitação até a fase "midi-log" ($A_{600} \approx 0,3-0,4$). IPTG foi então adicionado para concentração final de 1 mM e a suspensão foi incubada por mais 4 horas, a 37° C com agitação (Sambrook & cols., 1989).

2.19.2. Indução da expressão de haFGF e bbFGF utilizando pET-3d

A cultura de E. coli BL21(DE3) transformada com seu respectivo vetor foi incubada em meio LBA (ampicilina 50 ug ml⁻¹) a 37° C, sob agitação, até que a A₆₀₀ atingisse valores entre 0,7 e 1,0. IPTG foi adicionado para concentração final de 0,4 mM e a incubação prosseguiu por mais 3 horas (Studier & cols., 1990).

2.20. Preparação das amostras de proteínas

2.20.1. Mini-preparações de proteínas

Para a verificação inicial do nível de expressão da proteína partiu-se de 5 ml de cultura bacteriana. Antes da indução removeu-se 1 ml de cultura para um tubo "Eppendorf" que foi novamente incubado por mais 4 horas (pKK233-2) ou 3 horas (pET-3d). Centrifugou-se então por 1 minuto a 12.000 g. O sobrenadante foi removido por aspiração e o precipitado, ressuspenso em 100 ul de tampão de amostra para SDS-PAGE (seg. Laemmli), foi aquecido por 3 minutos em banho-maria fervente e centrifugado novamente (12.000 g por 1 minuto à temperatura ambiente). Esta amostra foi usada como controle não induzido. Aos 4 ml restantes da suspensão bacteriana IPTG foi adicionado conforme descrito em 2.19. Ao final do período de incubação (4 horas para pKK233-2 e 3 horas para pET-3d), procedeu-se como descrito acima para o controle não induzido, removendo-se 1 ml de cultura bacteriana induzida para outro tubo "Eppendorf" (Sambrook & cols., 1989; Studier & cols., 1990).

Antes de ser aplicada no gel de poliacrilamida-SDS, a amostra foi novamente aquecida (3 minutos, banho-maria fervente).

2.20.2. Preparação das amostras de proteínas em larga escala utilizando vetor pET-3d

Partiu-se de 3-5 litros de cultura bacteriana, a qual foi tratada conforme descrito em 2.19.2. As bactérias foram coletadas por centrifugação (7.000 rpm, 10 minutos, 4° C) e os precipitados bacterianos foram ressuspensos em tampão fosfato (TF) 10 mM pH 7,2 contendo 5 mM de EDTA (20 ml para cada litro de cultura bacteriana induzida) e congelados por uma noite a -70° C. A seguir, as bactérias foram descongeladas e mantidas a 4° C; após a adição de PMSF (Phenylmethane Sulfonyl Fluoride, concentração final 500 nM) foram rompidas numa "French Press" (4 passagens a 16.000 psi). A suspensão resultante foi centrifugada a 15.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi coletado e o precipitado reextraído com TF 10 mM pH 7,2 contendo NaCl 2,5 M. Os dois sobrenadantes foram reunidos e a concentração final de NaCl foi ajustada para aproximadamente 0,5 M com a adição de TF 10 mM pH 7,2. O precipitado final foi descartado.

2.21. Cromatografia de afinidade em coluna de Heparina-Sepharose (HS)

O material solúvel obtido conforme descrito acima foi adicionado, com o auxílio de bomba peristáltica, a uma coluna de Heparina-Sepharose CL-6B (Pharmacia, 2,5 cm X 4,0 cm) previamente equilibrada (TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 0,5 M para haFGF e TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 0,6 M para bbFGF).

Para haFGF, a eluição foi realizada segundo duas metodologias: (1) gradiente de NaCl por etapas - a coluna foi inicialmente eluída com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 0,5 M (37 frações de 10 ml cada, até $A_{280}=0,0$), depois com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 1,5 M (30 frações de 5 ml cada, até $A_{280}=0,0$) e finalmente com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 2,5 M (10 volumes, até $A_{280}=0,0$); e (2) gradiente linear de NaCl - a coluna foi inicialmente eluída com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 0,5 M ("Batch" até $A_{280}=0,0$), depois com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 0,7 M (17 frações de 10 ml cada, até

$A_{280}=0,0$). Um gradiente linear de NaCl (0,7 M a 1,8 M) foi então aplicado (50 ml de cada solução, em TF 10 mM pH 7,2 - 20 frações de 5 ml cada). Depois, a coluna foi eluída com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 1,8 M (20 frações de 5 ml cada, até $A_{280}=0,0$) e finalmente com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 2,5 M (10 volumes, até $A_{280}=0,0$).

Quanto ao bbFGF, a eluição foi realizada apenas por gradiente linear de NaCl. A coluna foi inicialmente eluída com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 0,6 M ("Batch", até $A_{280}=0,0$), depois com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 1,0 M (30 frações de 10 ml cada, até $A_{280}=0,0$), e então o gradiente linear de NaCl (1,0 M a 2,5 M) foi aplicado (50 ml de cada solução, em TF 10 mM pH 7,2 - 20 frações de 5 ml cada). Por fim, a coluna foi eluída com TF 10 mM pH 7,2 / NaCl 2,5 M (10 volumes, até $A_{280}=0,0$).

O fluxo utilizado para a eluição dos dois FGFs não ultrapassou $0,8 \text{ ml min.}^{-1}$.

2.22. Ensaio de atividade biológica

Fibroblastos das linhagens Swiss 3T3 e Balb/c 3T3 foram utilizados. Estoques celulares foram mantidos em garrafas plásticas contendo meio DME com 10% de FCS e uma mistura de 5% de CO_2 + 95% de ar comprimido.

A partir dos estoques, suspensões celulares contendo $2,0 \times 10^4$ células ml^{-1} de meio DME com 5% de FCS foram obtidas por tripsinização. Adicionou-se 1ml por placa (bandejas de 24 placas de 1,5 cm de diâmetro, Costar) e incubou-se a 37°C por 24 horas. A seguir, as células foram lavadas com PBS (1,5 ml - 2 vezes para Swiss 3T3 ou 2,0 ml - 1 vez para Balb/c 3T3) e incubadas por 48 horas em 0,5 ml de meio DME contendo 0,2% de FCS (Swiss 3T3) ou 0,5% de FCS (Balb/c 3T3). Aliquotas das amostras foram então adicionadas e a cultura foi mantida por 12 horas a 37°C . [^3H -metil] Timidina ($0,5 \text{ uCi ml}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-7}$, concentração final) foi então adicionada e a amostra foi incubada por mais 12 horas a 37°C . No final, o meio foi eliminado por sucção e as células tratadas com TCA 5% (4°C , 5 minutos) e lisadas com 0,2 ml de

NaOH 0,5 N (30 minutos, 50° C). Os lisados foram adsorvidos em filtros de papel Whatman nº 17 (1,5 cm X 1,5 cm), lavados com TCA 5% gelado, etanol 95% e acetona. Depois de secos, os filtros foram mergulhados em líquido de cintilação e a radioatividade incorporada no DNA foi medida num espectrômetro de cintilação líquida.

A atividade das amostras (% R) foi calculada considerando-se como máximo de atividade (100% R) controles estimulados com 5% de FCS (Swiss 3T3) e 10% de FCS (Balb/c 3T3).

2.23. Dosagem de proteína (Bradford, 1976)

As amostras foram preparadas e analisadas conforme procedimento para microensaios descrito no manual de instruções do "Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD Laboratories)".

3. RESULTADOS

3.1. Transformação de *E. coli*

Todas as transformações de bactérias com plasmídeos foram realizadas conforme descrito (2.3).

A seleção dos transformantes foi feita por crescimento clonal em placas de 5,0 cm de diâmetro contendo meio LBA. Partiu-se de duas suspensões: Suspensão 1 (descrita em MATERIAIS E METODOS) e Suspensão 2 (suspensão 1 aproximadamente vinte vezes concentrada). Plaquearam-se cerca de 50 ul de cada suspensão. Os resultados estão ilustrados na Tabela 1.

Foram feitos controles: (1) plaqueando-se as bactérias transformadas (suspensão 1) em placa sem antibiótico: houve grande crescimento de colônias; (2) plaqueando-se as bactérias não competentes em placas com (LBA) e sem (LB) antibiótico: não houve crescimento de colônias na placa LBA, enquanto as bactérias cresceram normalmente na placa LB.

Tabela I. Seleção de bactérias transformantes em placas LBA.

Plasmídeo	Número de colônias	
	suspensão 1	suspensão 2
pJJ11-1 (<i>E. coli</i> HB101)	9	153
pJC3-5 (<i>E. coli</i> HB101)	23	160
pKK233-2 (<i>E. coli</i> JM105)	1500	incontáveis
pET-3d (<i>E. coli</i> HMS174)	36	500

Suspensão 1 - proveniente da reação de transformação bacteriana (1,2ml); Suspensão 2 - suspensão 1 aproximadamente vinte vezes concentrada.

3.2. Extração e purificação de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada conforme descrito em "MATERIAIS E METODOS".

A concentração de DNA plasmidial mostrada na Tabela II foi estimada pela A_{260} (utilizou-se $A_{260}=1$ equivalente a 50 μg de DNA ml^{-1} , Maniatis & cols., 1982). As absorvâncias foram obtidas com o DNA solubilizado em TE pH 7,5.

Tabela II. Concentração de DNA plasmidial estimada após extração.

Concentração de DNA plasmidial			
DNA	mg ml^{-1}	Total (3 ml)	A_{260}/A_{280}
pJJ11-1	11,6	34,8 mg	2,25
pJC3-5	11,1	33,3 mg	2,26
pKK233-2	7,3	21,9 mg	2,08
pET-3d	4,9	14,7 mg	2,06

A contaminação por proteínas foi estimada pela relação A_{260}/A_{280} . A relação de absorvâncias em torno de 2 indica preparações de baixa contaminação por proteínas. Estas preparações foram então submetidas à purificação em gradiente de cloreto de césio, conforme descrito em "MATERIAIS E METODOS". Após extração do brometo de etídio (com álcool isoamílico) e diálise, os DNAs na forma "supercoil" foram precipitados com etanol 100% (por uma noite, -20°C), lavados uma vez com etanol 80% por centrifugação e solubilizados em 0,2 X TE pH 7,5.

Foram feitas novas medidas de concentração de DNA plasmidial (forma "supercoil" - Tabela III) e realizou-se eletroforese em gel de agarose para verificação da qualidade do plasmídeo extraído (Figura 9).

Tabela III. Concentração de DNA plasmidial (forma "supercoil") após purificação em gradiente de cloreto de césio.

Quantidade de DNA			
DNA	mg ml ⁻¹	Total(0,5 ml)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
pJJ11-1	1,53	0,77 mg	2,17
pJC-3-5	1,66	0,83 mg	2,17
pKK233-2	1,60	0,80 mg	2,09
pET-3d	3,20	1,60 mg	2,08

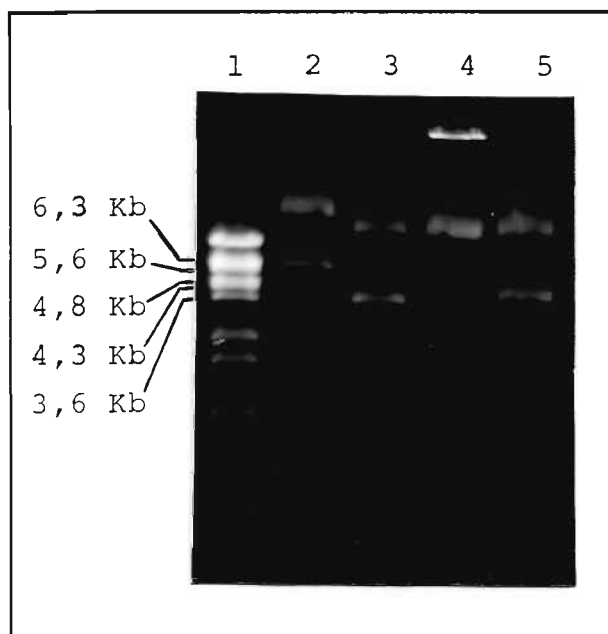


Figura 9. Eletroforese das preparações de vários DNAs plasmidiais (forma "supercoil"). Poço 1 - λ BstEII; Poço 2 - pJJ11-1; Poço 3 - pJC3-5; Poço 4 - pKK233-2; Poço 5 - pET-3d.

Observou-se que mesmo após a purificação do DNA plasmidial em gradiente de cloreto de césio, não ocorreu uma separação completa entre as formas "supercoil" e com "nicks". Entretanto, comparando-se as bandas dos padrões de PM com as bandas das amostras verificou-se que as formas "supercoil" estavam dentro do esperado.

Para a verificação da qualidade dos plasmídeos, estes foram digeridos com HindIII, para cuja enzima havia um sítio único de restrição em todos os plasmídeos (Figura 10).

A preparação de plasmídeos na forma "supercoil" foi considerada adequada para uso posterior, uma vez que a eletroforese mostrou a presença de uma banda proeminente.

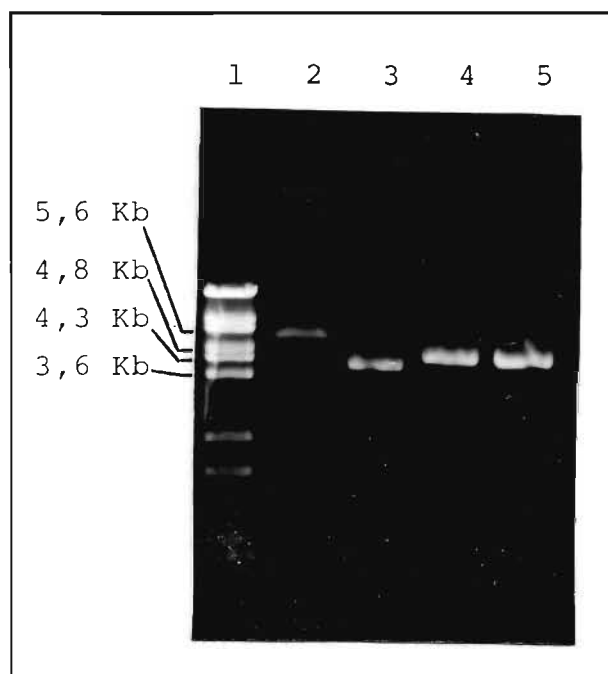


Figura 10. Eletroforese das preparações de DNAs plasmidiais após digestão com HindIII. Poço 1 - λ BstEII; Poço 2 - pJJ11-1; Poço 3 - pJC3-5; Poço 4 - pKK233-2; Poço 5 - pET-3d.

3.3. Obtenção dos plasmídeos de expressão de FGF

3.3.1. Obtenção de pJKA-1

(vetor pKK233-2 contendo o inserto para haFGF)

A estratégia de subclonagem de haFGF em pKK233-2 foi descrita no item 2.12.1. Sobre a mistura de reação de ligação, foram adicionados 200 μ l de suspensão bacteriana competente (*E. coli* JM105). Os passos seguintes são iguais aos descritos no item 2.3. Os controles de eficiência do antibiótico e de viabilidade bacteriana mostraram os resultados esperados. Na Tabela IV estão ilustrados os resultados desta transformação bacteriana.

Tabela IV. Clones transformados pela reação de ligação pKK233-2 + haFGF.

suspensão	Nº de clones transformantes
1	1
2	22

suspensão 1 - proveniente da reação de transformação bacteriana; suspensão 2 - suspensão 1 aproximadamente vinte vezes concentrada. Observou-se um baixo número de clones transformantes.

Da placa correspondente à suspensão 2 foram escolhidos 10 clones ao acaso para propagar, isolar e identificar os respectivos plasmídeos. Para isso, foram feitas mini-preparações de plasmídeos conforme descrito em "MATERIAIS E METODOS". Para verificar se houve inserção do fragmento de haFGF no plasmídeo pKK233-2, digeriu-se separadamente uma amostra de plasmídeos de todos os clones com a enzima de restrição HindIII; as amostras foram aplicadas em um gel horizontal (11 cm X 13,5 cm) preparado a partir de agarose 1% dissolvida em 0,5 X TBE (Figura 11).

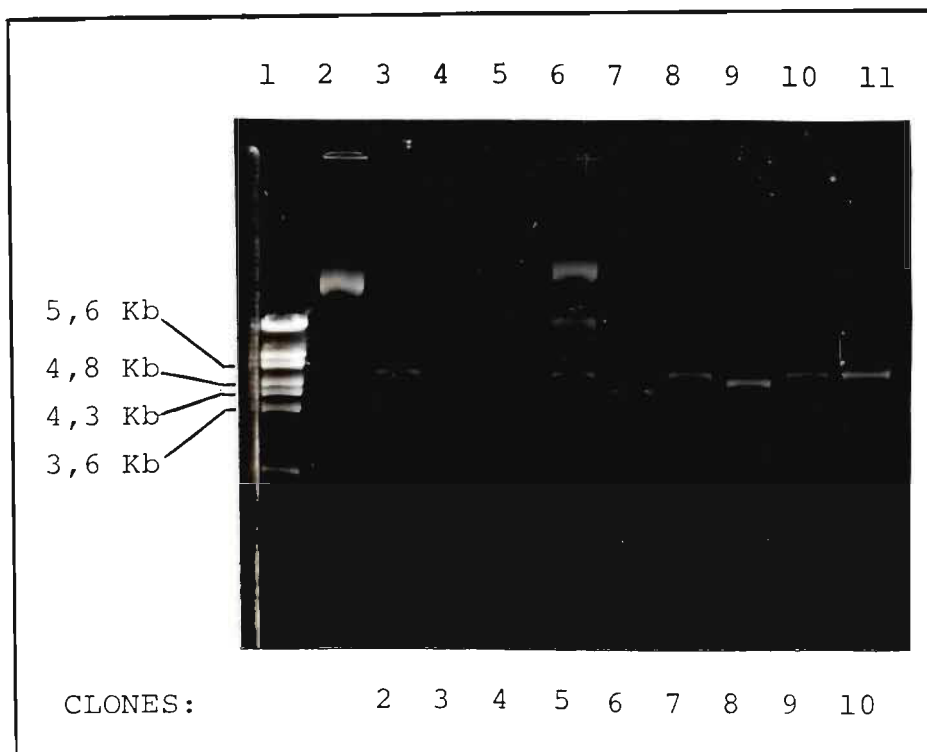


Figura 11. Eletroforese dos plasmídeos dos clones isolados da placa proveniente da suspensão 2 (Tabela IV), digeridos com HindIII. Poço 1 - λ BstEII; Poço 2 - pKK233-2 digerido com HindIII; Poços 3 a 11 - indicados na figura.

Aparentemente, os clones 2, 4, 5, 7, 9 e 10 apresentam o fragmento de haFGF, uma vez que houve aumento de "peso molecular" dos plasmídeos digeridos. O clone 1 já havia sido digerido com HindIII, e a eletroforese mostrou que não houve inserção do fragmento (dado não mostrado).

Para certificar se houve inserção, estes clones (já digeridos com HindIII) foram digeridos com EcoRI. Esperava-se obter um fragmento com aproximadamente 750 bp após eletroforese em gel de agarose, o que efetivamente ocorreu (Figura 12), confirmando a presença do fragmento de haFGF. O plasmídeo assim gerado foi designado pJKA-1.

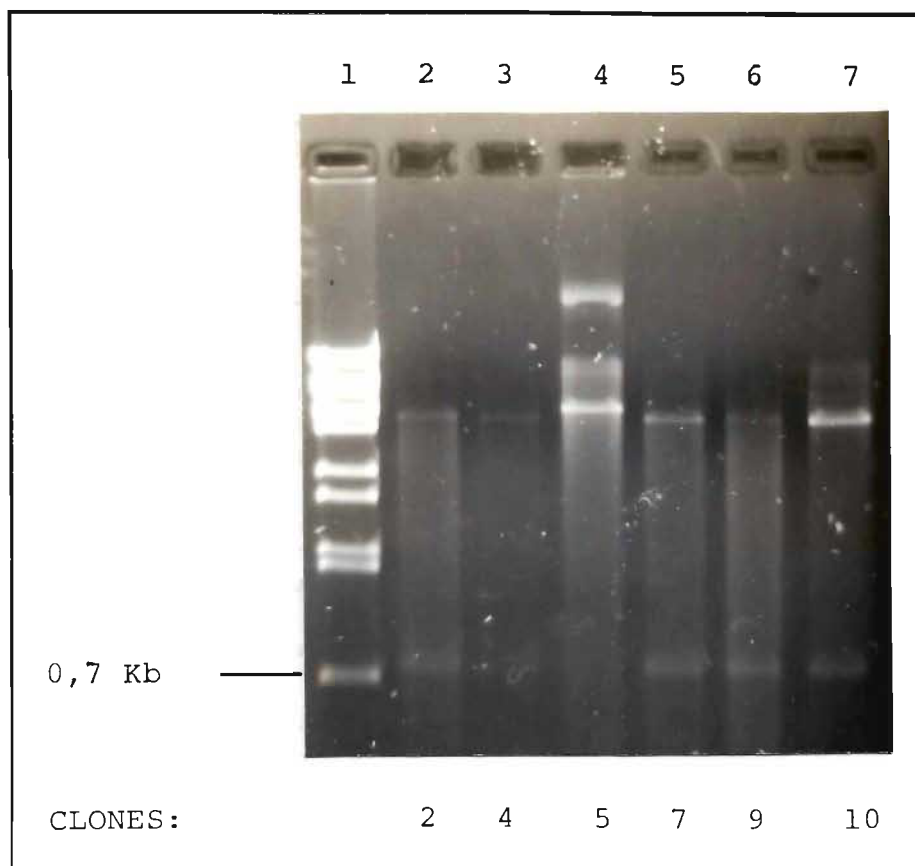


Figura 12. Eletroforese dos 6 clones digeridos com HindIII e EcoRI que apresentaram aumento no "PM" após digestão com HindIII. Poço 1 - λ BstEII; Poços 2 a 7 - indicados na figura.

3.3.2. Obtenção de pJEA-1

(vetor pET-3d contendo o inserto para haFGF)

A estratégia de subclonagem de haFGF em pET-3d foi descrita no item 2.12.2. Sobre a mistura de reação de ligação, foram adicionados 200 μ l de suspensão bacteriana competente (E. coli HMS174). Os passos seguintes foram iguais aos descritos no item 2.3. Os resultados estão ilustrados na Tabela V.

Tabela V. Resultados da transformação de E. coli HMS174 com os plasmídeos gerados da ligação de pET-3d (NcoI-HindIII) + haFGF (NcoI-HindIII). Para a reação de transformação foram misturados 200 μ l de bactéria competente e 10 μ l do vetor (volume da reação de ligase). No controle da reação de transformação (pET-3d) foram adicionados 2 μ l do vetor. Para verificar o número de clones transformantes, 50 μ l das suspensões bacterianas foram plaqueadas sobre meio LBA (ampicilina 50 μ g ml⁻¹). A suspensão 1 provém da reação de transformação e a suspensão 2 corresponde à suspensão 1 aproximadamente vinte vezes concentrada. Foram feitos controles de viabilidade bacteriana e eficiência do antibiótico, conforme descrito em 3.1.

Amostra	Proporção	Nº de clones transformantes	
		Suspensão 1	Suspensão 2
pET-3d + haFGF	(1:1)	5	87
pET-3d + haFGF	(1:3)	200	1000
pET-3d + haFGF	(1:5)	5	86
pET-3d digerido e incubado com ligase	-	0	0
pET-3d digerido	-	0	0
pET-3d	-	23	250

O número de transformantes obtido após a reação realizada na proporção 1:5 foi semelhante à da 1:1. Este resultado pode ser devido à formação de concatâmeros entre os fragmentos de haFGF.

Dentre os clones transformantes foram escolhidos cinco ao acaso para verificar se realmente houve inserção do fragmento de haFGF. Foram feitas então mini-preparações de plasmídeos (conforme "MATERIAIS E METODOS") e estes foram digeridos com HindIII separadamente. Verificou-se que, aparentemente, todos os clones continham o inserto, uma vez que houve um ligeiro aumento de tamanho (PM) (haFGF = 468 bp) em relação ao pET-3d (NcoI-HindIII) isolado (dados não mostrados). Este vetor foi denominado pJEA-1.

3.3.3. Obtenção de pJEB-1

(vetor pET-3d contendo o inserto de bbFGF)

O cDNA da porção codificadora do gene nativo de bbFGF (fragmento NcoI-Sau3AI - Figura 3) foi inicialmente subclonado em pET-3d (digerido com NcoI-BamHI). Ao induzir os clones bacterianos contendo este vetor (pET-3d + bbFGF nativo), observou-se, após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS das amostras, que não houve a produção de proteínas em quantidades visíveis através de coloração com Coomassie-Blue, sugerindo baixa expressão (dados não mostrados).

Resultados descritos na literatura sugeriam que modificações da sequência codificadora nativa possibilitariam a expressão da proteína em maior quantidade (Knoerzer & cols., 1989). Estas modificações levavam em conta basicamente dois aspectos: (1) utilização de codons mais frequentes nos genes bacterianos altamente expressos e (2) necessidade de se evitar a formação de estruturas secundárias muito estáveis no mRNA, principalmente no início da mensagem. Seguindo esta abordagem, cerca de 60 pares de bases da extremidade 5' da região codificadora do cDNA nativo foram substituídas por oligonucleotídeos sintéticos. Esta substituição permitiu diminuir o conteúdo de citosina mais guanosina que era de 77,9% para 57,6% (Figura 5). A nova sequência da região codificadora do cDNA de bbFGF (bbFGFmodif.)

foi inicialmente subclonada em pUC19, para posterior sequenciamento, como descrito no item 2.12.3.

Obtiveram-se cerca de 2.000 clones resistentes à ampicilina após transformação de E. coli JM105 com a mistura de reação (etapa 4 do item 2.12.3). Foram escolhidos 20 clones ao acaso para verificar se houve inserção do fragmento de bbFGFmodif. em pUC19. Os DNAs plasmidiais destes foram digeridos com EcoRI e PstI; após eletroforese em gel de agarose de 7 clones obtiveram-se dois que continham o fragmento esperado de aproximadamente 1,3 Kb (Figuras 8 e 13.a). Este plasmídeo foi denominado pAUXB-1. O fragmento NcoI-Sau3AI (etapa 6 do item 2.12.3) foi subclonado em pET-3d conforme descrito na etapa 8 do item 2.12.3. A mistura da reação de ligação sofreu processo semelhante ao utilizado para obtenção de pJEA-1 (tabela V). Obtiveram-se cerca de 20 clones transformantes.

Como seria difícil visualizar o fragmento de cDNA de bbFGF inserido em pET-3d (existem 22 sítios de Sau3AI em pBR322), os clones recombinantes foram selecionados através da expressão de proteínas. Para tanto, transformaram-se culturas de E. coli BL21(DE3) com os plasmídeos destes clones que foram induzidos com IPTG (conforme item 2.19.2). Dos 20 clones, apenas 3 expressaram o bbFGF (Clones 8, 10 e 13 - Figura 16), concluindo-se daí que os vetores destes clones possuem o fragmento NcoI-Sau3AI de 466 bp (item 2.12.3). Este vetor foi denominado pJEB-1 (Figura 13.b).

A porção 5' da região codificadora de bbFGFmodif. foi sequenciada conforme descrito no item 2.13, confirmando-se o resultado esperado (Figura 5.b).

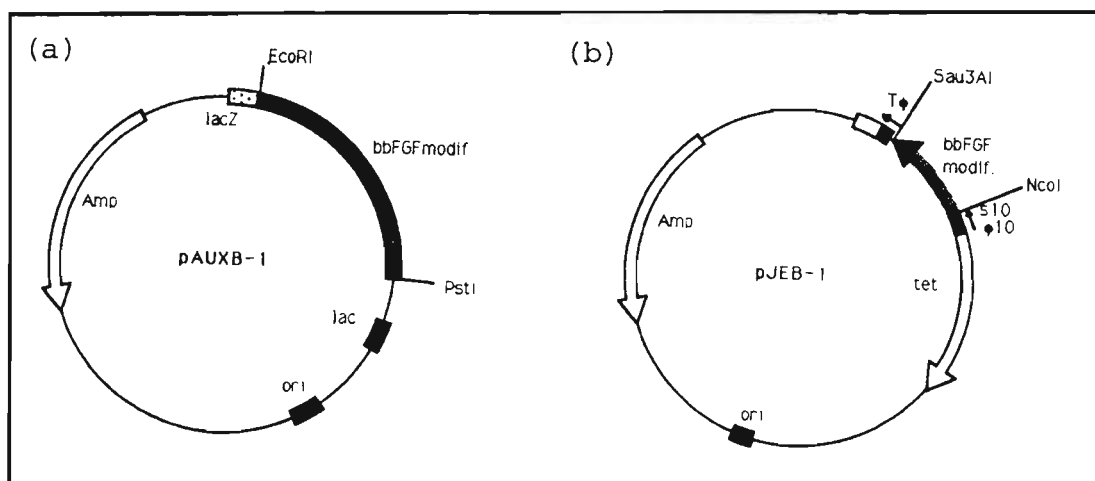


Figura 13. Plasmídeos com bbFGFmodif. (a) pAUXB-1 - fragmento de DNA que contém a região codificadora do gene de bbFGFmodif. de aproximadamente 1,3 kb subclonado nos sítios PstI e EcoRI de pUC19; (b) pJEB-1 - formado através da ligação da região codificadora (466 bp) do gene de bbFGFmodif. nos sítios de NcoI e BamHI de pET-3d.

3.4. Expressão das proteínas

3.4.1. Expressão em pequena escala de haFGF com pKK233-2

Os clones de *E. coli* JM105 transformados com o plasmídeo pJKA-1 (Figura 12) foram induzidos com IPTG conforme descrito no item 2.19.1. Amostras de todos os clones induzidos, assim como dos controles não induzidos, foram aplicadas em um gel de poliacrilamida-SDS. Após a eletroforese, as frações proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi corada com Ponceau S ("MATERIAIS E METODOS") e fotografada (dados não mostrados). A membrana foi então incubada com o anti-soro anti-aFGF e a seguir com fosfatase alcalina, conforme descrito no item 2.16. Os resultados ilustrados na Figura 14 mostram uma banda na região esperada (cerca de 20 K); houve o aparecimento de duas outras bandas em regiões de "PM" maior que provavelmente são artefatos de técnica.

Como a quantidade de haFGF produzida por este sistema foi visível apenas através de reação com anticorpo, optou-se pelo sistema pET de expressão, com o objetivo de aumentar a produção de proteínas.

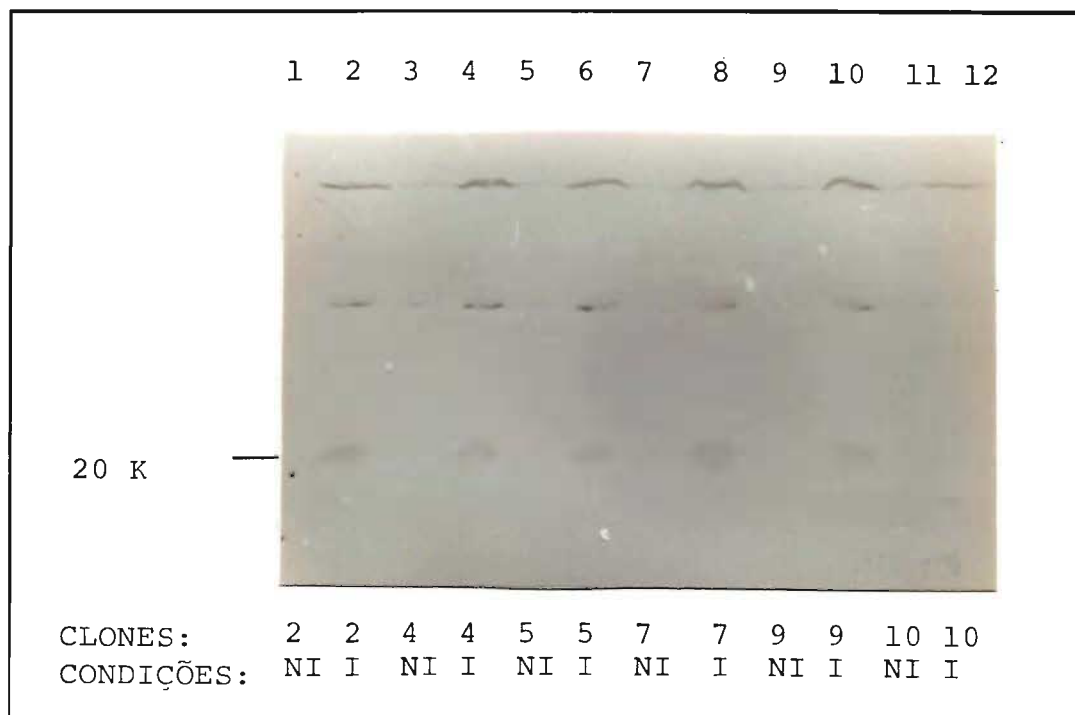


Figura 14. Western-blotting das frações protéicas das amostras induzidas (I) e não induzidas (NI) dos clones 2, 4, 5, 7, 9 e 10 de haFGF utilizando sistema pKK. As quantidades de proteínas das amostras não induzidas adicionadas ao gel de poliacrilamida-SDS são equivalentes às das amostras induzidas por IPTG.

3.4.2. Expressão de haFGF e bbFGF com pET-3d

3.4.2.1. Expressão em pequena escala

Bactérias E. coli BL21(DE3) transformadas separadamente com preparações de plasmídeos (pJEA-1 - 5 clones e pJEB-1 - 3 clones) foram induzidas com IPTG (item 2.19.2) e as amostras geradas (item 2.20.1) foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Figuras 15 e 16).

Não se detectou a banda mais evidente na região de PM em torno de 18,4 K nos controles, ou seja, em bactérias não transformadas (poços 4 e 5 - Fig. 15.b e poços 10 e 11 - Fig. 16) e em bactérias transformadas somente com o vetor sem inserto (poços 6 e 7 - Fig. 15.b e poços 12 e 13 - Fig. 16).

Isto é uma indicação de que as bandas mais intensas, detectadas nos clones induzidos, sejam de haFGF (Fig. 15) e bbFGF (Fig. 16).

Os clones que apresentaram maior nível de expressão de proteínas foram os de nº 2 e 5 (haFGF) e o de nº 8 (bbFGF), provavelmente porque as bactérias estavam na concentração mais adequada para expressão (A_{600} entre 0,8-0,9). Não é clara no momento a razão pela qual o Clone 4 não expressou haFGF (poço 8 - Fig.15.a).

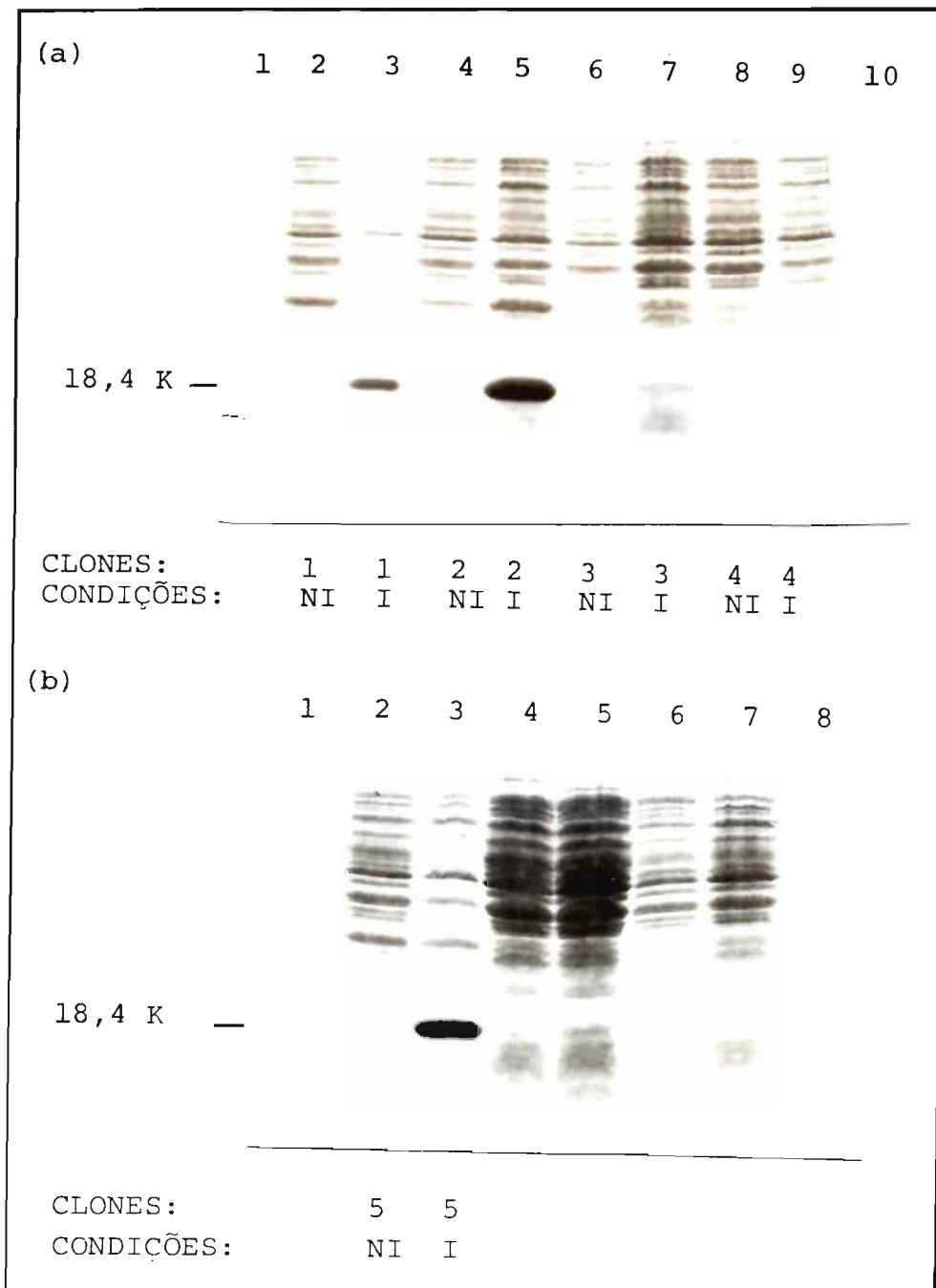


Figura 15. SDS-PAGE para verificação do nível de expressão de haFGF utilizando sistema pET. (a) Poços 1 e 10 - B-lactoglobulina (PM=18,4 KDa); Poços 2 a 9 - indicados na figura. (b) Poços 1 e 8 - B-lactoglobulina; Poços 2 e 3 - indicados na figura; Poço 4 - *E. coli* BL21(DE3) NI; Poço 5 - *E. coli* BL21(DE3) I; Poço 6 - pET-3d NI; Poço 7 - pET-3d I.

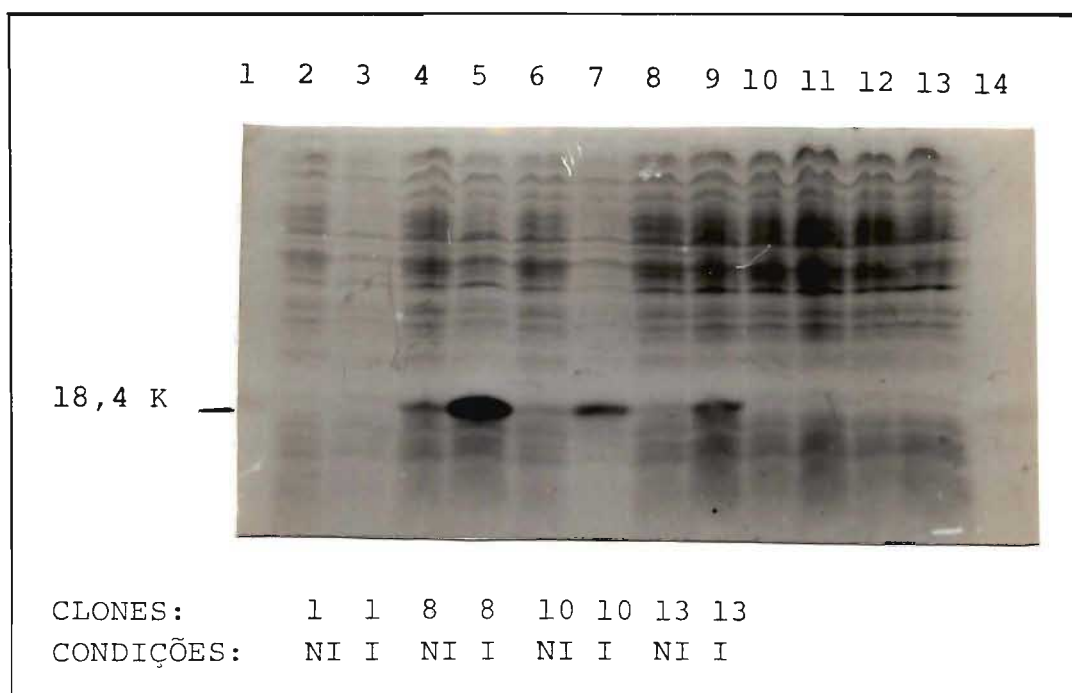


Figura 16. SDS-PAGE de 1 clone que não expressou e de 3 que expressaram bbFGF utilizando sistema pET. Poços 1 e 14 - B-lactoglobulina; Poços 2 a 9 - indicados na figura; Poço 10 - E. coli BL21(DE3) NI; Poço 11 - E. coli BL21(DE3) I; Poço 12 - pET-3d NI; Poço 13 - pET-3d I.

3.4.2.2. Expressão em larga escala

Os clones 2 (haFGF) e 8 (bbFGF) foram escolhidos para obtenção de grande quantidade das proteínas. As preparações foram feitas conforme item 2.20.2. Assumindo-se que $A_{280}=1$ corresponde a 1 mg ml^{-1} de proteína (Thomas & cols., 1984), obteve-se cerca de 1500 mg com E. coli BL21(DE3) + pJEA-1, e cerca de 1300 mg com E. coli BL21(DE3) + pJEB-1 de proteína total por litro de cultura induzida.

3.5. Purificação dos FGFs

3.5.1. Purificação de haFGF e Ensaio de Atividade Mitogênica das frações cromatográficas

3.5.1.1. Eluição através de gradiente de NaCl por etapas

A concentração de NaCl de todas as frações eluídas da coluna por este procedimento foi estimada a partir da medida do índice de refração. A quantidade de proteínas eluídas em cada fração foi estimada a partir da A_{280} . A maioria das proteínas é eluída com 0,5 M de NaCl, correspondendo ao material que não adsorve ou adsorve fracamente na resina. Com 1,5 M de NaCl, a medida de A_{280} aumenta e decresce rapidamente formando um pico agudo. O material eluído com 2,5 M não foi incluído nas análises porque resultados anteriores (não mostrados) indicaram que este não apresentava atividade e a quantidade de proteínas eluída era pequena. A finalidade desta eluição era limpar a coluna das proteínas que têm grande afinidade por HS (Figura 17).

Para o estudo de atividade mitogênica, as frações eluídas com NaCl 0,5 M foram agrupadas (grupo 1 - frações 1-10; grupo 2 - frações 11-30 e grupo 3 - frações 31-40). Como se esperava que o haFGF fosse eluído com 1,5 M de NaCl, todas as frações coletadas nesta etapa foram analisadas individualmente. As amostras foram testadas nas concentrações finais de 1, 10 e 100 ng ml^{-1} . A

figura 17 mostra o perfil da atividade mitogênica das amostras na concentração de 100 ng ml^{-1} (item 2.23).

Verificou-se que o pico de A_{260} subia rapidamente quando a concentração de NaCl aproximava-se de 1,5 M e que a curva de atividade mitogênica estava deslocada para a direita. Isto era o esperado, uma vez que nesta região o haFGF deve estar mais puro, o que pode ser comprovado analisando-se o padrão de bandas obtido em SDS-PAGE (Figura 18).

Uma banda mais evidente em torno de 18,4 K começou a surgir a partir da fração 41 (concentração de NaCl - 0,70 M), tornando-se mais intensa nas frações posteriores. O pico de atividade abrangeu as frações 45-48. Nestas frações, a banda de 18,4 K representou a maior parte do material corado com Coomassie-Blue. Não temos dados no momento para dizer se a separação em duas bandas, que é mais evidente a partir da fração 46, indica a presença de formas microheterogêneas.

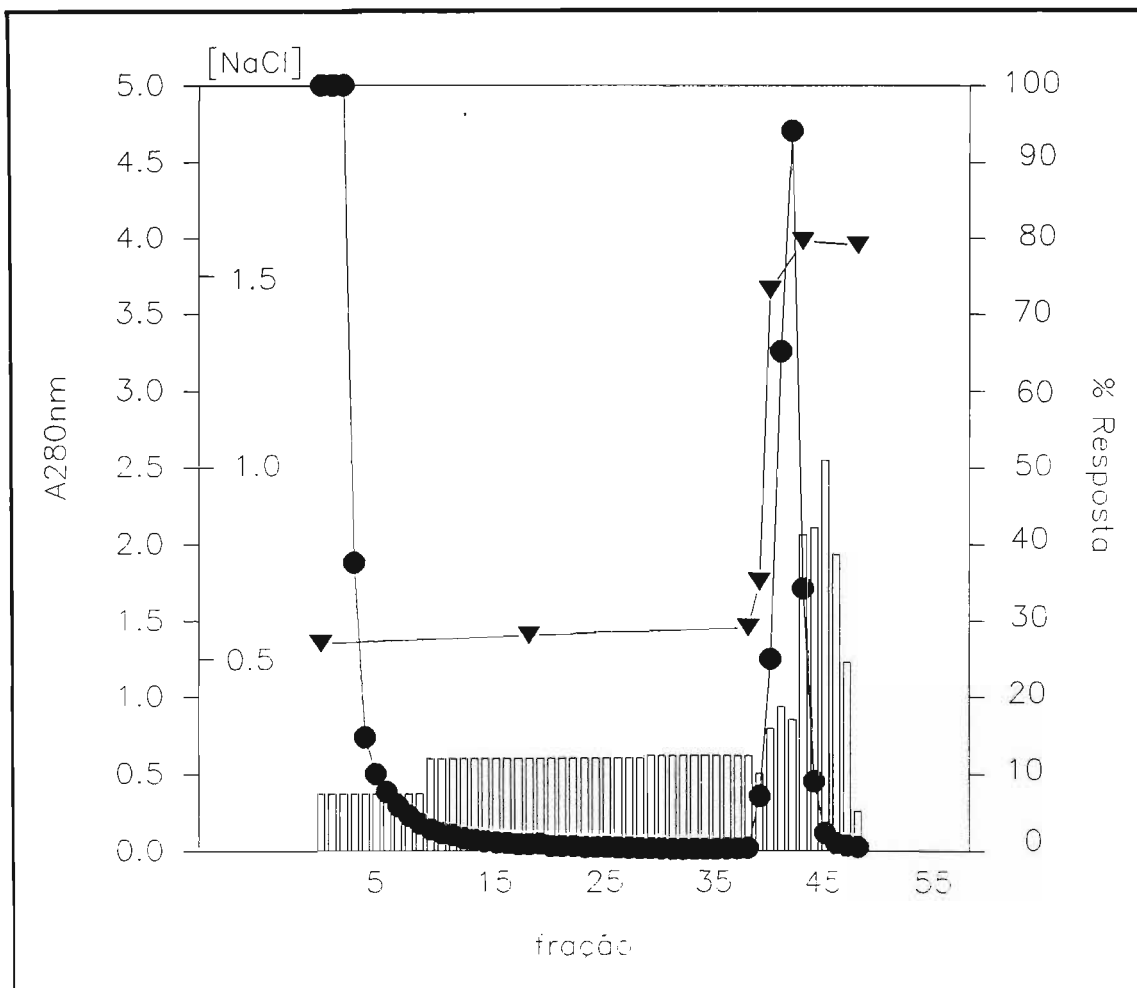


Figura 17. Eluição de haFGF através de gradiente por etapas de NaCl. Gráfico das medidas da A_{280nm} (●), da concentração de NaCl (▼) e da atividade mitogênica (100 ng ml⁻¹) das frações eluídas da coluna HS (□).

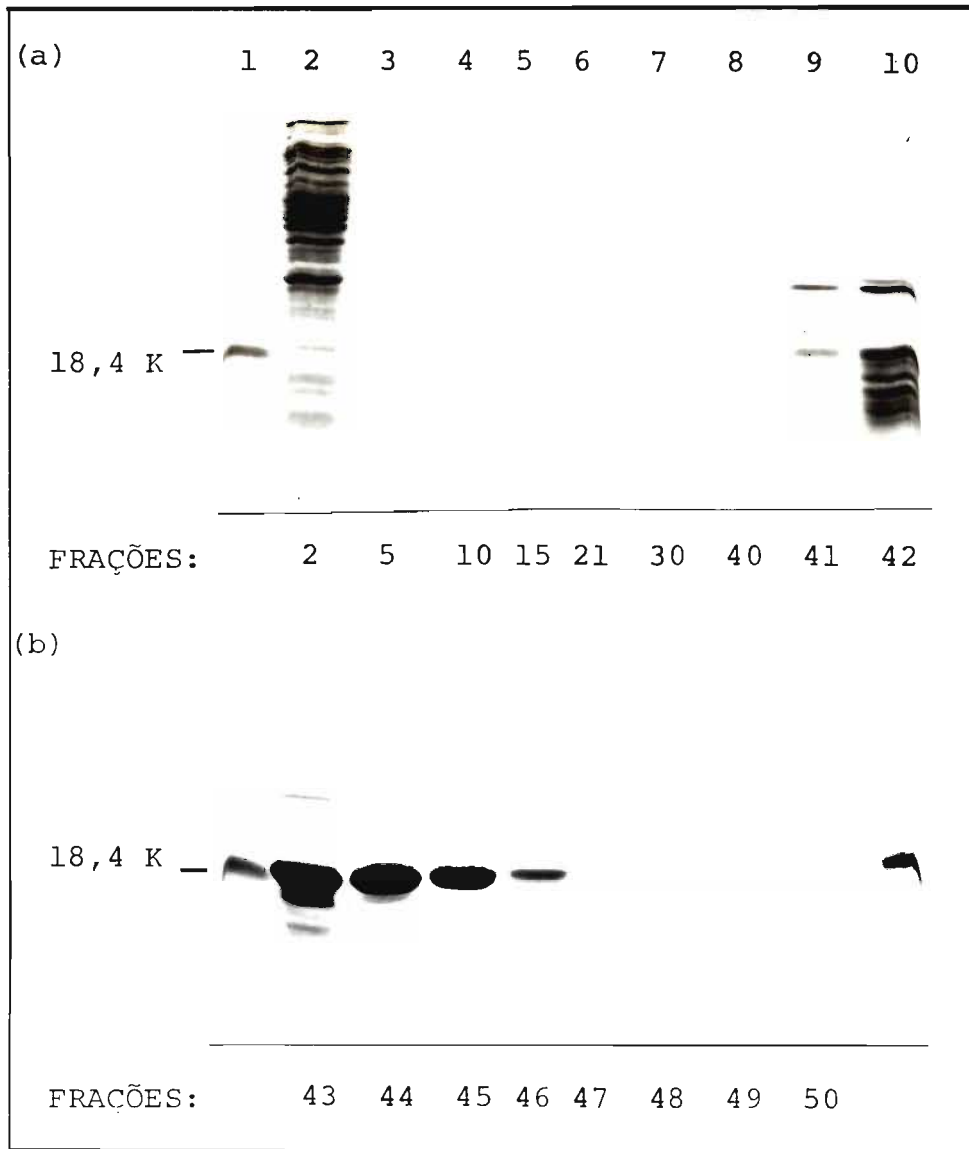


Figura 18. Purificação de haFGF utilizando-se gradiente de NaCl por etapas. SDS-PAGE das principais frações eluídas da coluna de HS. A eluição foi realizada lavando-se a coluna com TF 10 mM pH 7,2 nas seguintes concentrações de NaCl: 0,5 M, 1,5 M e 2,5M. As amostras foram diluídas v:v com tampão de amostra (seg. Laemmli) aplicando-se 10 μ l por amostra. (a) Poço 1 - B-lactoglobulina; Poços 2 a 10 - indicados na figura; (b) Poços 1 e 10 - B-lactoglobulina; Poços 2 a 9 - indicados na figura.

3.5.1.2. Eluição através de gradiente linear de NaCl

Como mostra a Figura 18, não ocorreu uma boa separação do haFGF eluindo-o da coluna de HS através do aumento da concentração de NaCl por etapas. No sentido de melhorar a purificação desta proteína, o material retido na coluna foi eluído através de gradiente linear de NaCl conforme item 2.21. A concentração de NaCl e a quantidade de proteína em cada fração eluída da coluna, por este procedimento, foram estimadas conforme item 3.5.1.1 e os resultados estão ilustrados na Figura 19.

Para o estudo de atividade mitogênica (item 2.22) do material eluído, todas as frações do gradiente de NaCl foram testadas na concentração final de 200 ng ml⁻¹ (item 2.23) (Figura 19).

Verificou-se que nas frações do gradiente de NaCl: (1) a A₂₆₀ aumentava com a concentração salina formando um pico largo ao redor de 1,0-1,2 M, quando começava a diminuir até tornar-se desprezível ao redor de 1,5 M; e (2) a atividade mitogênica era semelhante em todas as frações. Este resultado era esperado, uma vez que o haFGF era eluído com um grau de pureza da ordem de 95% ou mais já no início do gradiente, exibindo uma única banda visível por coloração com Coomassie-Blue após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Figura 20). Qualquer uma destas frações pode ser utilizada para ensaios posteriores.

As concentrações de proteínas de todas as frações do gradiente de NaCl foram medidas conforme item 2.23 e estimou-se um rendimento de haFGF na ordem de 40 mg por litro de cultura bacteriana induzida, na fração solúvel.

Para um estudo mais detalhado da atividade mitogênica do haFGF recombinante, curvas de dose-resposta foram realizadas, conforme item 2.22, da proteína sozinha e na presença de heparina.

O haFGF sozinho era ativo na ordem de ng ml⁻¹, com DE_{50%} (dose de estimulação correspondente a 50% de resposta) igual a 150 ng ml⁻¹ (Figura 21).

Para estabelecer a concentração potenciadora ideal de heparina, foram feitos ensaios de atividade mitogênica do haFGF (5 e 10 ng ml⁻¹) na presença de várias concentrações do glicosoaminoglicano (GAG). Verificou-se que em baixas concentrações não ocorria potenciação da atividade do haFGF. Resposta celular máxima foi obtida em torno de 5-10 ug ml⁻¹ do GAG; concentrações superiores levaram a uma inibição da síntese de DNA (dados não mostrados).

A Figura 21 mostra que a curva da atividade do haFGF na presença de 0,1 ug ml⁻¹ de heparina é semelhante a do fator na sua ausência (DE_{50%}=150 ng ml⁻¹), enquanto na presença de 10 ug ml⁻¹ a atividade é potenciada cerca de 5.000 vezes (DE_{50%}=0,03 ng ml⁻¹).

Verificou-se que a DE_{50%} da proteína, a resposta máxima da célula e a potenciação por heparina variam com as condições do ensaio e/ou do haFGF. Quanto maior o tempo da célula em cultura, menor a resposta perante o fator. Congelamentos e descongelamentos da proteína levaram a uma desnaturação que acarretou perda de atividade. Adição de heparina reverteu parcialmente este efeito (dados não mostrados). Verificou-se também que em altas concentrações de haFGF ocorreu inibição da síntese de DNA, tanto isoladamente, como na presença de heparina, efeito este que ainda não foi esclarecido.

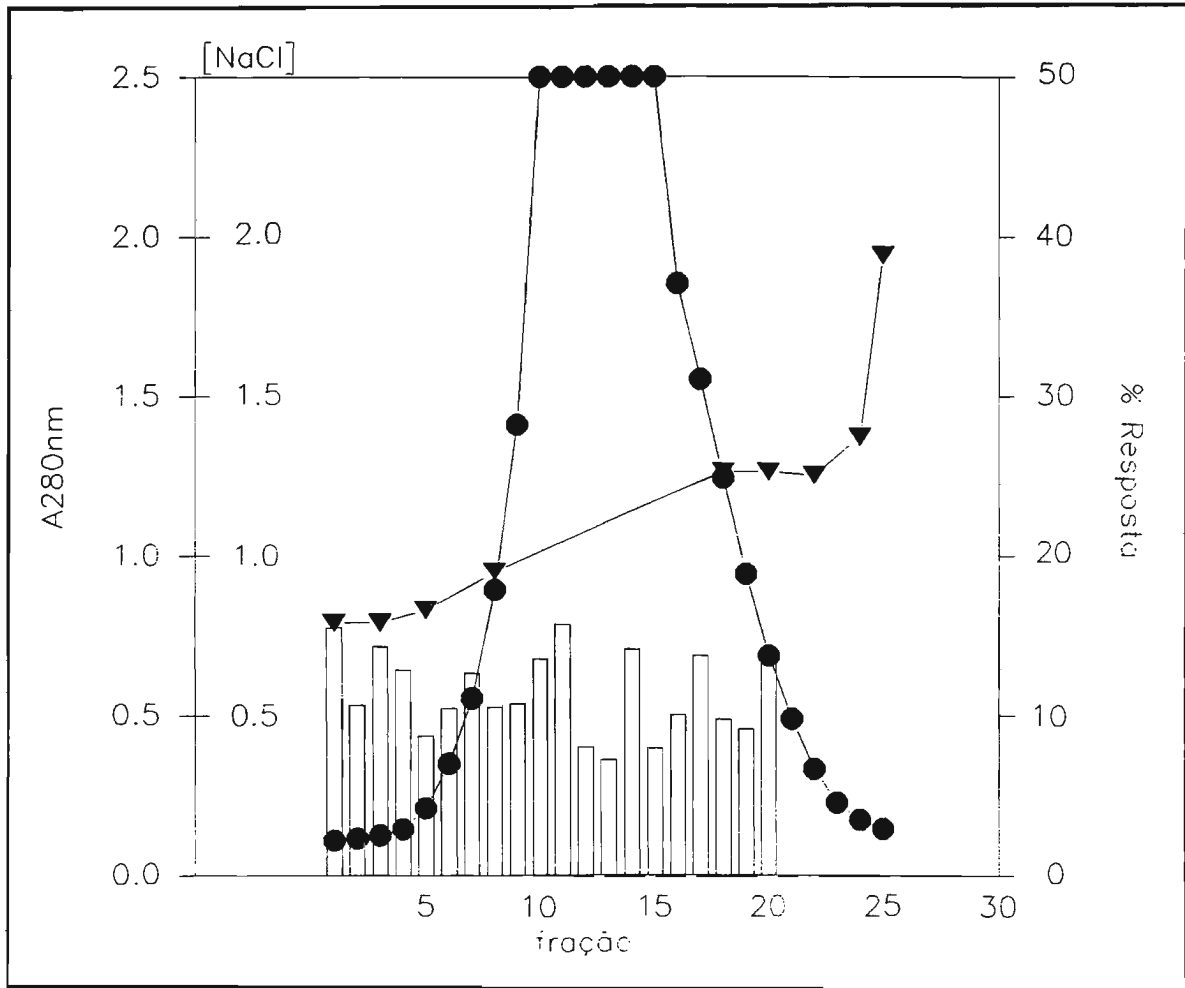


Figura 19. Eluição de haFGF através de gradiente linear de NaCl. Gráfico das medidas de A_{280} (●), da concentração de NaCl (▼) e da atividade mitogênica (200 ng ml^{-1}) das frações eluídas da coluna de HS (□).

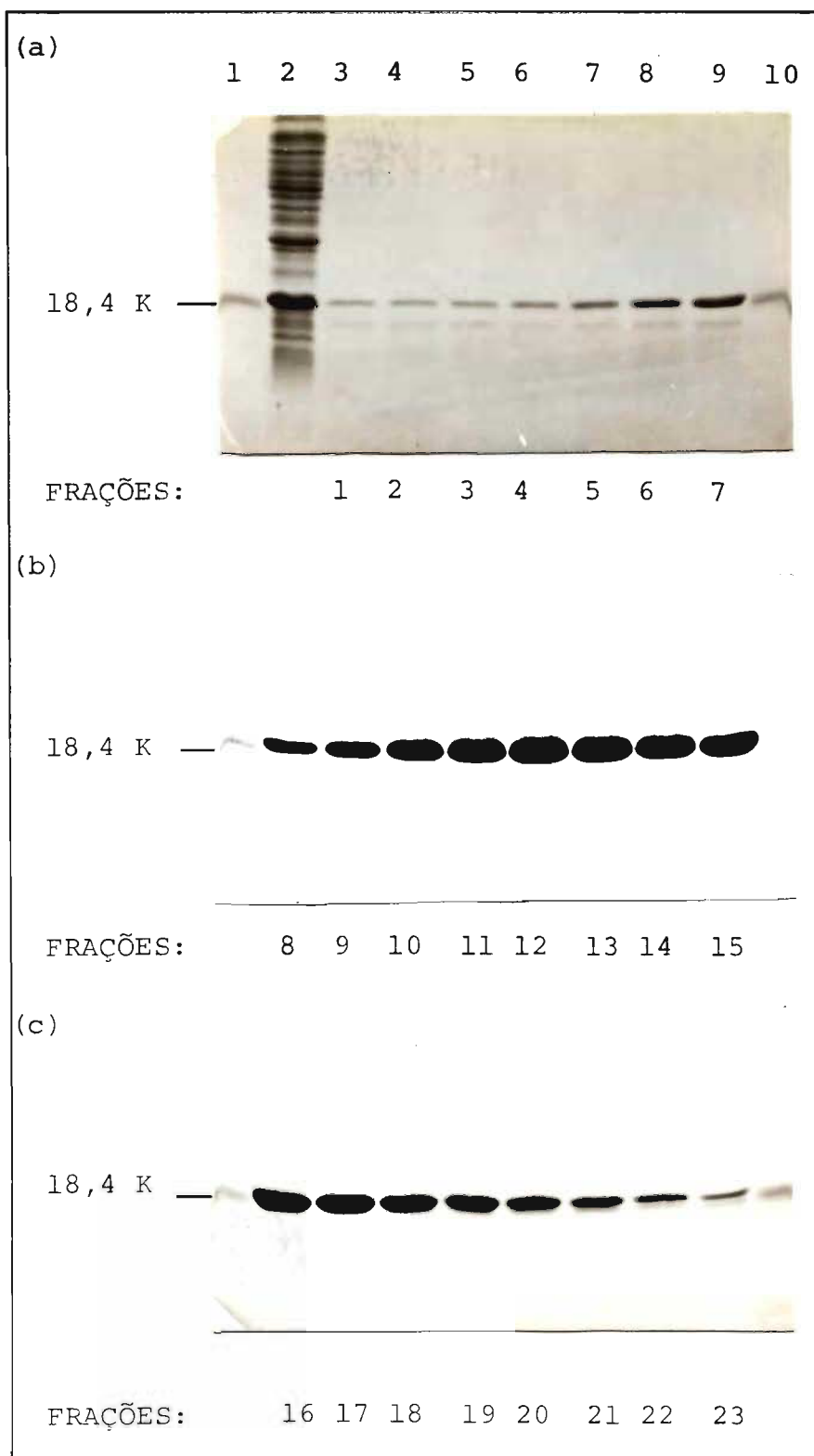


Figura 20. Purificação de haFGF utilizando-se gradiente linear de NaCl. SDS-PAGE das frações eluídas da coluna de HS. O material foi eluído da coluna com TF nas seguintes concentrações de NaCl: 0,5 M, 0,7 M, gradiente 0,7 M - 1,8 M, 1,8 M e 2,5 M. As amostras foram preparadas conforme legenda da Figura 18. (a) Poços 1 e 10 - B-lactoglobulina; Poço 2 - extrato cru; Poços 3 a 9 - indicados na figura. (b) Poços 1 e 10 - B-lactoglobulina; Poços 2 a 9 - indicados na figura. (c) Poços 1 e 10 - B-lactoglobulina; Poços 2 a 9 - indicados na figura.

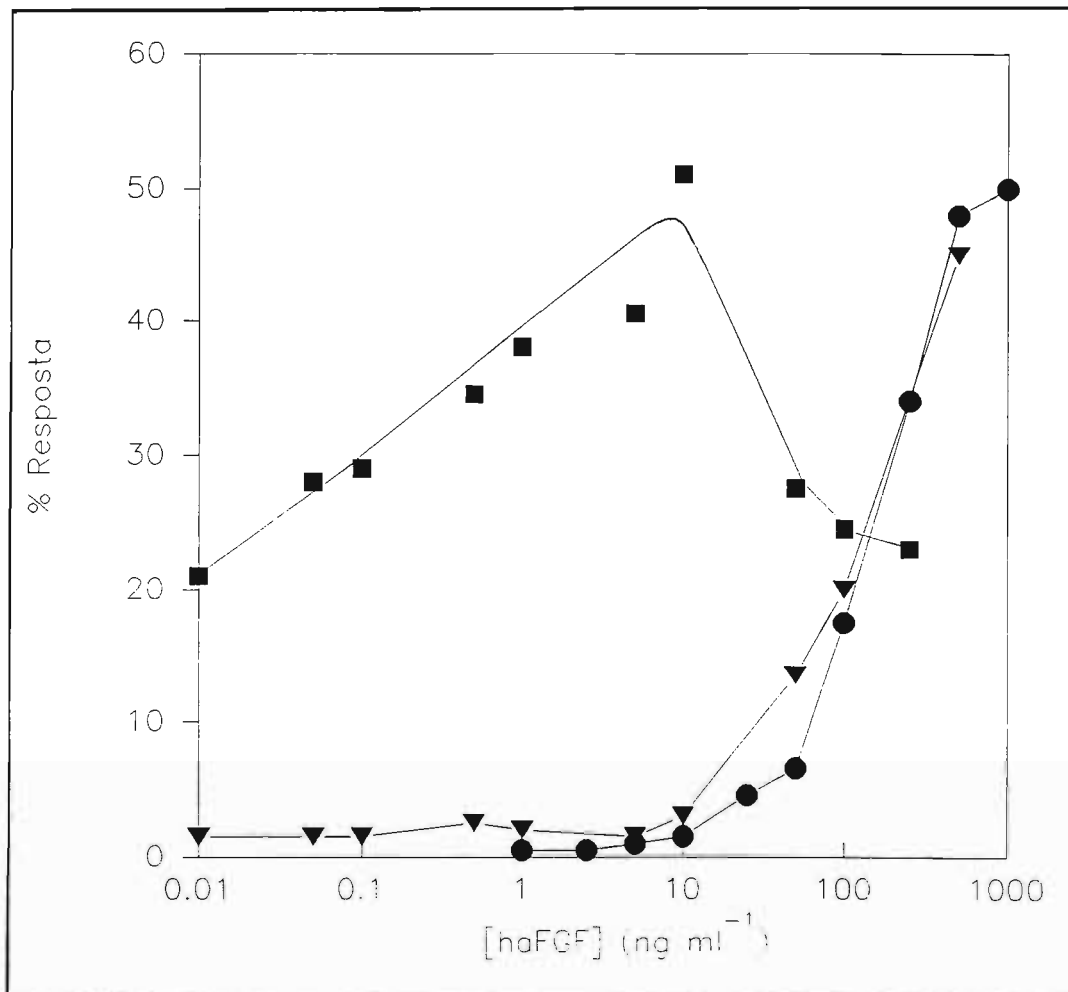


Figura 21. Curva de dose-resposta do haFGF e efeito de duas concentrações da heparina na atividade do haFGF. (●) haFGF sozinho, (▼) haFGF na presença de 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de heparina e (■) haFGF na presença de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de heparina.

3.5.2. Purificação de bbFGF e Ensaio de Atividade Mitogênica das frações cromatográficas

Como mostra a Figura 20, o haFGF foi eluído da coluna de HS com um grau de pureza da ordem de 95%. Optou-se então por purificar o bbFGF por este método, conforme descrito em 2.21.

As estimativas das concentrações de NaCl e de proteína em cada fração eluída da coluna foram realizadas conforme item 3.5.1.1. Os resultados estão mostrados na Figura 22.

Para o estudo da atividade mitogênica das frações cromatográficas, as de números 4-12 do gradiente de NaCl foram testadas nas concentrações finais de 100 e 500 pg ml^{-1} . A Figura 22 mostra os resultados na concentração 500 pg ml^{-1} .

Verificou-se que o bbFGF começou a ser eluído com aproximadamente 1,2 M de NaCl (fração 4), formando um pico agudo com um pequeno arraste deslocado para a direita.

A Figura 23 mostra que esta proteína é eluída da coluna de HS com uma pureza da ordem de 95% ou maior.

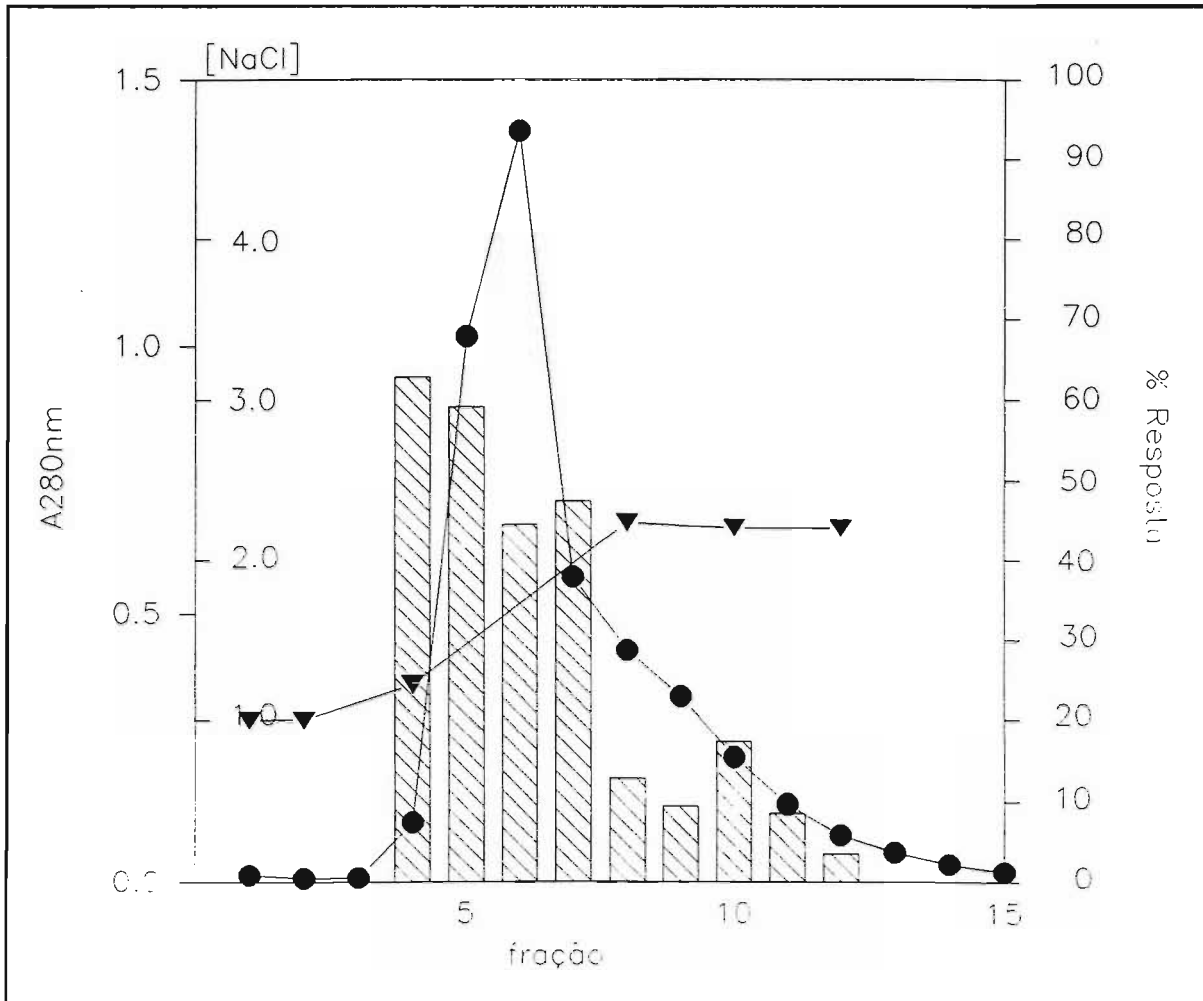


Figura 22. Eluição de bbFGF através de gradiente linear de NaCl. Gráfico das medidas da A_{280} (●), da concentração de NaCl (▼) e da atividade mitogênica (500 pg ml^{-1}) das frações 4-12 do gradiente (▨).

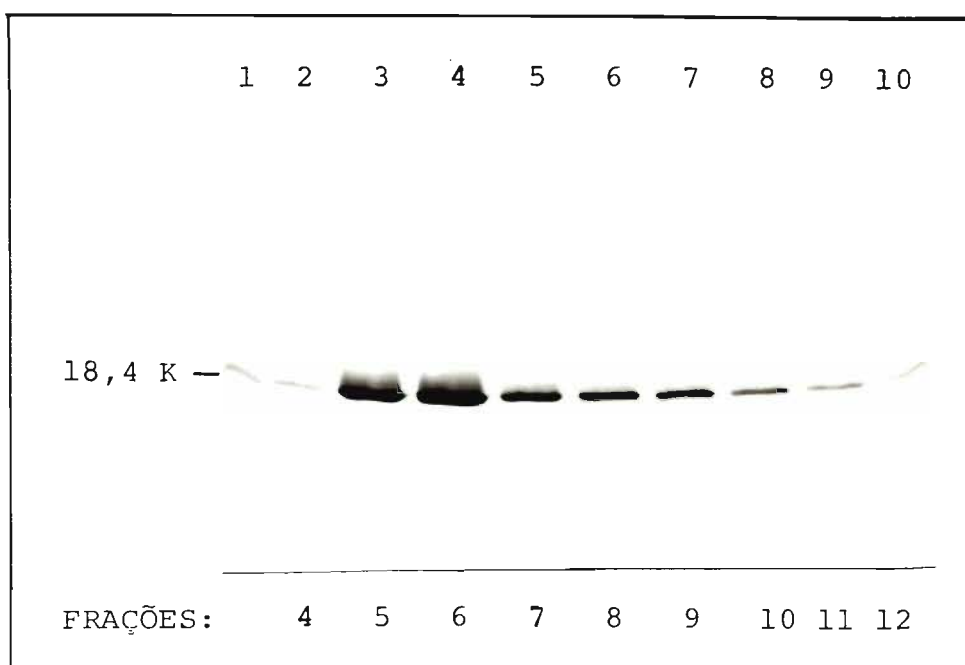


Figura 23. Purificação de bbFGF através de gradiente linear de NaCl. SDS-PAGE das frações eluídas da coluna de HS. O material foi eluído da coluna com TF 10 mM pH 7,2 nas seguintes concentrações de NaCl: 0,6 M, 1,0 M, gradiente linear 1,0 - 2,5 M e 2,5 M. As amostras foram preparadas conforme legenda da Figura 18. Poço 1 - B-lactoglobulina; Poços 2 a 10 - indicados na figura.

O gel de poliacrilamida-SDS após eletroforese das frações do gradiente de NaCl corado com Coomassie-Blue mostrou que o bbFGF foi eluído da coluna de HS com uma pureza da ordem de 95% ou mais (Figura 23). Nota-se nesta figura um arraste acima da banda principal, para o qual ainda não se tem uma explicação. Mediu-se a concentração de proteínas destas frações conforme item 2.23, estimando-se um rendimento de bbFGF na ordem de 10 mg por litro de cultura bacteriana induzida, na fração solúvel.

Todos os ensaios posteriores foram realizados com proteínas com este grau de pureza.

Ensaios de dose-resposta do bbFGF foram realizados e verificou-se que este é ativo na faixa de pg ml^{-1} e que a heparina não apresenta efeito significativo sobre o fator (dados não mostrados).

3.6. Análises da composição e sequenciamento de aminoácidos dos FGFs produzidos

Estas análises foram realizadas pelo Dr. Angelo Geraldo Gambarini.

A composição de aminoácidos das duas proteínas foi determinada após hidrólise com HCl em fase gasosa, separação dos aminoácidos em coluna de troca iônica e pós-derivatização com ninhidrina (Spackman & cols., 1958). Estas análises foram efetuadas em um analisador de aminoácidos modelo SYSTEM 6300 - Beckman.

As sequências N-terminais do haFGF e do bbFGF foram determinadas num sequenciador automático após pré-derivatização com PITC (Hunkapiller & cols., 1986) das proteínas adicionadas ao sequenciador (modelo 473A-01 - Applied Biosystems).

Aparentemente há apenas uma forma de haFGF correspondendo à proteína autêntica de 154 aminoácidos. Duas formas de bbFGF recombinantes foram encontradas, uma correspondendo à proteína autêntica de 154 aminoácidos (cerca de 75%) e outra contendo 153

(cerca de 25%) sendo que os dois primeiros resíduos (Met-Ala) foram removidos (Figura 1).

4. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de sistemas adequados para a produção de dois componentes da família dos FGFs: o FGF ácido humano (pI 5-6) e o FGF básico bovino (pI 9-10). Esta proposição foi subdividida em três fases: (1) construção dos vetores de expressão contendo as sequências gênicas adequadas; (2) produção de FGF em escala laboratorial; e (3) purificação e caracterização química e biológica dos produtos obtidos.

Inicialmente optamos por expressar as proteínas em E. coli usando o vetor pKK233-2, no qual as sequências gênicas ficam sob controle do promotor trc (Amann & Brosius, 1985). Apesar de alguns dados da literatura indicarem alta expressão dos FGFs neste sistema (Jaye & cols., 1987; Linemeyer & cols., 1987), conseguimos expressar o haFGF em quantidades detectáveis somente por anticorpos (Figura 14). Modificações das condições de cultura ou de indução (resultados não mostrados) não melhoraram o nível de expressão.

No sentido de aumentar a produção dos FGFs, optamos por um sistema que utiliza a T7 RNA polimerase para a expressão seletiva de DNAs (Studier & cols., 1990), uma vez que esta enzima é cerca de cinco vezes mais ativa do que a de E. coli, e dados de literatura mostravam altos níveis de expressão de bFGF (Squires & cols., 1988) e aFGF humanos (Watanabe & cols., 1990) neste sistema. Embora maior expressão de haFGF tenha sido obtida, o mesmo não aconteceu para o bbFGF. Este resultado parece indicar que neste último caso o problema não estaria relacionado com a menor disponibilidade de mRNA específico.

Os trabalhos de produção de aFGF em E. coli publicados na literatura mostram que os autores utilizaram cDNAs totalmente sintéticos (Linemeyer & cols., 1987; Barr & cols., 1988; Watanabe & cols., 1990; Ke & cols., 1990) ou com o início da sequência codificadora trocada por oligonucleotídeos sintéticos (Jaye & cols., 1987), correspondentes às formas truncadas da proteína. O

maior nível de expressão foi de 50 mg por litro de cultura induzida (Ke & cols., 1990), da proteína na forma [16-155] (ver Figura 2). Neste trabalho, conseguimos expressar cerca de 40 mg por litro de cultura, da proteína autêntica [2-155] (ver Figura 2), com cDNA nativo pouco modificado (ver página 13).

Quanto ao bFGF, os trabalhos publicados na literatura mostram a utilização de: (1) cDNAs sintéticos correspondentes às formas truncadas da proteína (Barr & cols., 1988; Fox & cols., 1988; Knoerzer & cols., 1989); (2) cDNA correspondente à proteína de 154 aminoácidos onde o início da sequência foi substituída por oligonucleotídeos sintéticos (Thompson & cols., 1991); (3) cDNA nativo correspondente à forma truncada (Iwane & cols., 1987); e (4) cDNA nativo acrescido de três codons antes do ATG inicial do hbFGF, formando uma "proteína de fusão" contendo 157 aminoácidos, (Squires & cols., 1988). Destes, Squires & cols. (1988) e Thompson & cols. (1991) obtiveram os maiores níveis de expressão (cerca de 40 mg por litro de cultura induzida). Neste trabalho, utilizando cDNA nativo, não conseguimos expressar o bbFGF em quantidades visíveis através de coloração por Coomassie-Blue (dados não mostrados). Modificamos então a sequência codificadora nativa de modo que: (1) o número de codons que são mais frequentes nos genes bacterianos altamente expressos aumentasse, e (2) a formação de estrutura secundária muito estável no mRNA, principalmente no início da mensagem diminuísse. Para isso, cerca de 60 pares de bases da extremidade 5' da região codificadora do cDNA de bbFGF foram substituídas por oligonucleotídeos sintéticos, diminuindo o conteúdo de citosina mais guanosina de 77,9% para 57,6%. Com esta nova construção (Figuras 5.b e 13.b), a produção de bbFGF foi da ordem de 10 mg por litro de cultura bacteriana induzida, na fração solúvel (Figura 16). Não temos evidências diretas de que com este cDNA modificado tenha diminuído a formação de estrutura secundária estável do mRNA, aumentado o nível de mRNA específico, ou que a introdução dos "codons bacterianos" tenha contribuído para aumentar a expressão. Entretanto, é possível que o aumento da expressão da proteína se deva a uma combinação destes vários fatores. Thompson & cols.

(1991) obtiveram maior rendimento na produção de bFGF usando a mesma abordagem, talvez porque tenham substituído cerca 120 bp do início da sequência codificadora. Os nossos níveis de expressão correspondem somente à proteína solúvel intracelular. Não foi verificado se parte dos FGFs é secretado para o meio (embora não seja esperado pois não tem peptídeo sinal para isso) e também não se tentou recuperar FGF da fração insolúvel (corpos de inclusão) uma vez que isto exige tratamentos drásticos, que levam à perda de atividade.

Os FGFs foram purificados pelo procedimento que envolve basicamente: (1) obtenção de um extrato bacteriano através de congelamento-descongelamento e passagem por "French-Press" e (2) cromatografia da fração solúvel em Heparina-Sepharose pela qual os FGFs têm afinidades diferentes: o haFGF é eluído desta resina com cerca de 1,0 M de NaCl enquanto o bbFGF requer cerca de 1,5 M do sal. Estas duas etapas são suficientes para dar origem a proteínas com um grau de pureza da ordem de 95% ou mais, exibindo uma única banda visível por coloração com Coomassie-Blue após eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (Figuras 20 e 23). A caracterização química posterior dos FGFs foi feita com proteínas neste estágio de purificação.

Foram determinadas as composições de aminoácidos e as sequências N-terminais das duas proteínas. Os resultados indicaram que as proteínas produzidas têm as sequências primárias corretas. Os sequenciamentos mostraram ainda que praticamente 100% das metioninas iniciais de ambas as proteínas foram removidas e que no bbFGF cerca de 25% das moléculas perderam também o segundo resíduo (alanina) durante o processamento na bactéria. Portanto, as proteínas resultantes devem corresponder aos fatores de crescimento autênticos (haFGF de 154 aminoácidos - Jaye & cols., 1986, e bbFGF de 153/154 aminoácidos - Abraham & cols., 1986a). Estes resultados indicam que os FGFs recombinantes obtidos são adequados para futuros estudos do laboratório.

As atividades biológicas dos dois fatores foram estudadas através de ensaios de estimulação de síntese de DNA em

fibroblastos das linhagens Swiss 3T3 e Balb/c 3T3. O haFGF recém-preparado mostrou-se ativo ao nível de ng ml^{-1} , e esta atividade desloca-se para a faixa de pg ml^{-1} quando heparina é adicionada ao meio de incubação. O mecanismo de ação da heparina não está totalmente esclarecido, mas é possível que envolva mudança da conformação do FGF e/ou aumento da afinidade pelo receptor de membrana (Schreiber & cols., 1985). Já o bbFGF parece ser ativo na faixa de pg ml^{-1} e a heparina não exerce efeito significativo sobre este, embora dados de literatura mostrem a importância da heparina quanto ao aumento de afinidade do fator ao receptor de alta afinidade (Yayon & cols., 1991). Esta diferença entre as atividades dos FGFs ácido e básico em ensaios mitogênicos sobre fibroblastos e outros tipos celulares é também observada entre as proteínas extraídas de tecidos como cérebro e hipófise (Gospodarowicz, 1987). Os resultados descritos acima indicam, portanto, que as diferenças de atividades encontradas entre as proteínas recombinantes não se devem a artefatos como, por exemplo dobramento incorreto. Por outro lado, preparações de FGFs recombinantes guardadas por muito tempo e submetidas a sucessivas etapas de congelamento e descongelamento sofrem um processo de inativação progressiva, devida aparentemente à formação de dímeros através de ligações dissulfeto entre cadeias diferentes (Robinson, 1991). Adição de heparina a essas preparações reverte apenas parcialmente o processo (Schreiber & cols., 1985). Um outro fator que deve ser levado em consideração quanto à atividade dos fatores é que eles adsorvem nas paredes dos tubos de plásticos. Isto pode ser diminuído, utilizando-se: (1) PBS contendo BSA (1 mg ml^{-1}) ou heparina (25 ug ml^{-1}) ou DTT (10 mM) (Kan & cols., 1991); (2) "3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate" (CHAPS) (Matuo & cols., 1991) como diluente dos fatores. Neste trabalho utilizamos PBS contendo ovoalbumina (250 ug ml^{-1}) para os ensaios de atividade mitogênica. Esta metodologia havia sido utilizada anteriormente com os FGFs extraídos de tecidos (Ho & cols., 1988). Embora algumas alíquotas de FGF tenham sido armazenadas na presença de heparina, não temos dados no momento que indiquem

que o GAG efetivamente proteja as preparações de FGF da perda de atividade por adsorção.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS *

- ABRAHAM, J.A.; MERGIA, A.; WHANG, J.L.; TUMOLO, A.; FRIEDMAN, J.; HJERRILD, K.A.; GOSPODAROWICZ, D. & FIDDES, J.C. (1986a). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* (Washington), **233**: 545 - 548.
- ABRAHAM, J.A.; WHANG, J.L.; TUMOLO, A.; MERGIA, A. & FIDDES, J.C. (1986c). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence, genomic organization, and expression in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**: 657 - 668.
- ABRAHAM, J.A.; WHANG, J.L.; TUMOLO, A.; MERGIA, A.; FRIEDMAN, J.; GOSPODAROWICZ, D. & FIDDES, J. C. (1986b). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.*, **5**: 2523 - 2528.
- AMANN, E. & BROSIUS, J. (1985). 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, **40**: 183 - 190.
- ARMELIN, H.A. (1973). Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 2702 - 2706.
- BAIRD, A. & KLAGSBRUN, M. (1991). The Fibroblast Growth Factor Family. *Cancer Cells*, **3**: 239 - 243.
- BAIRD, A.; MORMEDE, P.; YING, S.Y.; WEHREBERG, W.B.; UENO, N.; LING, N. & GUILLEMIN, R. (1985). A nonmitogenic pituitary function of fibroblast growth factor: regulation of thyrotropin and prolactin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 5545 - 5549.
- BARR, P.J.; COUSENS, L.S.; LEE-NG, C.T.; MEDINA-SELBY, A.; MASIARZ, F.R.; HALLEWELL, R.A.; CHAMBERLAIN, S.H.; BRADLEY, J.D.; LEE, D.; STEIMER, K.S.; POULTER, L.; BURLINGAME, A.L.; ESCH, F. & BAIRD, A. (1988). Expression and processing of biologically active fibroblast growth factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **263**: 16471 - 16478.

* Uma adaptação das normas para publicação do Journal Biological Chemistry, 1991. As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

- BLAM, S.B. MITCHELL, R.; TISCHER, E.; RUBIN, J.S.; SILVA, M.; SILVER, S.; FIDDES, J.C.; ABRAHAM, J.A. & AARONSO, S.A. (1988). Addition of growth hormone secretion signal to basic fibroblast growth factor results in cell transformation and secretion of aberrant forms of the protein. *Oncogene*, 3: 129 - 136.
- BOLIVAR, F.; RODRIGUEZ, R.L.; GREENE, P.J.; BETLACH, M.C.; HEYNEKER, H.L. & BOYER, H.W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. *Gene*, 2: 95 - 113.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 - 254.
- BURGESS, W.H. & MACIAG, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 575 - 606.
- BURGESS, W.H.; MEHLMAN, T.; MARSHAK, D.R.; FRASER, B.A. & MACIAG, T. (1986). Structural evidence that endothelial cell growth factor B is the precursor of both endothelial cell growth factor and acidic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7216 - 7220.
- CARTER, P. (1987). Improved oligonucleotide-direct mutagenesis using M13 vectors. *Methods Enzymol.*, 154: 382 - 403.
- COVARRUBIAS, L. & BOLIVAR, F. (1982). Construction and characterization of new cloning vehicles. VI Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene*, 17: 79 - 89.
- CRABB, J.W.; ARMES, L.G.; CARR, S.A.; JOHNSON, C.M.; ROBERTS, G.D.; BORDOLI, R.S. & MCKEEHAN, W.L. (1986). Complete primary structure of prostatropin, a prostate epithelial cell growth factor. *Biochemistry*, 25: 4988 - 4993.
- ESCH, F.; BAIRD, A.; LING, N.; UENO, N.; HILL, F.; DENORROY, L.; KLEPPER, R.; GOSPODAROWICZ, D.; BOHLEN, P. & GUILLEMIN, R. (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6507 - 6511.
- FLORKIEWICZ, R.Z. & SOMMER, A. (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate

translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3978 - 3981.

FOX, G.M.; SCHIFFER, S.G.; ROHDE, M.F.; TSAI, L.B.; BANKS, A.R. & ARAKAWA, T. (1988). Production, biological activity, and structure of recombinant basic fibroblast growth factor and an analog with cysteine replaced by serine. *J. Biol. Chem.*, 263: 18452 - 18458.

FUKUSHIMA, Y.; BYERS, M.G.; FIDDES, J.C. & SHOWS, T.B. (1990). The human basic fibroblast growth factor gene (FGFB) is assigned to chromosome 4q25. *Cytogenet. Cell Genet.*, 54: 159 - 160.

GIMENEZ-GALLEGO, G.; RODKEY, J.; BENNETT, C.; RIOS-CANDELORE, M.; DISALVO, J. & THOMAS, K. (1985). Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. *Science (Washington)*, 230: 1385 - 1838.

GOSPODAROWICZ, D. (1975). Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.*, 250: 2515 - 2520.

GOSPODAROWICZ, D. (1987). Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor. In: Barnes, D. & Sirbasku, D. A., ed., *Methods Enzymol.*, 147B: 106 - 119.

GOSPODAROWICZ, D.; BAIRD, A.; CHENG, J.; LUI, G.M.; ESCH, F. & BOHLEN, P. (1986). Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland: Physicochemical and biological characterization. *Endocrinology*, 118: 82 - 90.

GOSPODAROWICZ, D.; CHENG, J.; LUI, G.M.; BAIRD, A.; ESCH, F. & BOHLENN, P. (1985). Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 117: 2383 - 2391.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L. & NEUFELD, G. (1987a). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.*, 8: 95 - 114.

GOSPODAROWICZ, D.; NEUFELD, G. & SCHWEIGERER, L. (1987b). Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J. Cell. Physiol.*, 5 (Suppl.): 15 - 26.

HO, P.L.; CARPENTER, M.R.; SMILLIE, L.B. & GAMBARINI, A.G. (1990). Co-purification of proteases with basic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170: 769 - 774.

- HO, P.L.; JAKES, R.; NORTHROP, F.D. & GAMBARINI, A.G. (1988). Pituitary fibroblast growth factor: immunocharacterization of an acidic component and N-terminal sequence analysis of a truncated basic component. *Biochem. Int.*, 17: 973 - 980.
- HOLMES, D.S. & QUIGLEY, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, 114: 193 - 197.
- HUNKAPILLER, M.W.; GRANLUND-MOYER, K. & WHITELEY, N.W. (1986). - Gas-phase proteins/peptides sequencer. *In: Methods of protein microcharacterization: A practical handbook.* (John E. Shively, ed.) p. 223 - 247, Humana Press, Clifton.
- IMAMURA, T.; ENGLEKA, K.; ZHAN, X.; TOKITA, Y.; FOROUGH, R.; ROEDER, D.; JACKSON, A.; MAIER, J.A.M.; HLA, T.; MACIAG, T. (1990). Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* (Washington), 249: 1567 - 1570.
- IWANE, M.; KUROKAWA, T.; SASADA, R.; SENO, M.; NAKAGAWA, S. & IGARASHI, K. (1987). Expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 470 - 477.
- JAYE, M.; BURGESS, W.H.; SHAW, A.B. & DROHAN W.N. (1987). Biological equivalence of natural bovine and recombinant human α - endothelial cell growth factors. *J. Biol. Chem.*, 262: 16612 - 16617.
- JAYE, M.; HOWK, R.; BURGESS, W.; RICCA, G.A.; CHIU, I.M.; RAVERA, M.W.; O'BRIEN, S.J.; MODI, W.S.; MACIAG, T. & DROHAN, W.N. (1986). Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* (Washington), 233: 541 545.
- JAYE, M.; LYALL, R.M.; MUDD, R.; SCHLESSINGER, J. & SARVER, N. (1988). Expression of acidic fibroblast growth factor cDNA confers growth advantage and tumorigenesis to Swiss 3T3 cells. *EMBO J.*, 7: 963 - 969.
- KAN, M.; SHI, Er-Gang & MCKEEHAN, W.L. (1991). Identification and assay of fibroblast growth factor receptors. *Methods Enzymol.*, 198: 158 - 171.
- KE, Y.; FERNIG, D.G.; SMITH, J.A.; WILKINSON, M.C.; ANANDAPPA, S.Y.; RUDLAND, P.S. & BARRACLOUGH, R. (1990). High-level production of human acidic fibroblast growth factor in *E. coli* cells: inhibition of DNA synthesis in rat mammary fibroblasts

- at high concentrations of growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171: 963 - 971.
- KLAGSBRUN, M.; SMITH, S.; SULLIVAN, R.; SHING, Y.; DAVIDSON, S.; SMITH, J.A. & SASSE, J. (1987). Multiple forms of basic fibroblast growth factor: amino-terminal cleavages by tumor cell- and brain cell-derived acid proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 1839 - 1843.
- KNOERZER, W.; BINDER, H.P.; SCHNEIDER, K.; GRUSS, P.; MCCARTHY, J.E.G. & RISAU, W. (1989). Expression of synthetic genes encoding bovine and human basic fibroblast growth factors (bFGFs) in *Escherichia coli*. *Gene*, 75: 21 - 30.
- KUROKAWA, T.; SASADA, R.; IWANE, M. & IGARASHI, K. (1987). Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor. *FEBS Lett.*, 213: 189 - 194.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680 - 685.
- LIM, H.M. & PENE, J.J. (1988). Optimal conditions for supercoil DNA sequencing with the *Escherichia coli* DNA polymerase I large fragment. *Gene Anal. Tech.*, 5: 32 - 39. Apud: *Chem. Abstr.*, 109: 1830b, 1988.
- LINEMEYER, D.L.; KELLY, L.J.; MENKE, J.G.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; DI SALVO, J. & THOMAS, K.A. (1987). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for biologically active bovine acidic fibroblast growth factor. *Biotechnology*, 5: 960 - 965.
- MANDEL, M. & HIGA, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53: 159 - 162.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. (1982). - *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 545 p.
- MATUO, Y.; NISHI, N.; MATSUMOTO, K.; MIYAZAKI, K.; MATSUMOTO, K.; SUZUKI, F. & NISHIKAWA, K. (1991). 3-[[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propane sulfonate as noncytotoxic stabilizing agent for growth factors. *Methods Enzymol.*, 198: 511 - 518.
- MCKEEHAN, W.L. & CRABB, J.M. (1987). Isolation and characterization of different molecular and chromatographic

forms of heparin-binding growth factor 1 from bovine brain. *Anal. Biochem.*, 164: 563 - 569.

MERGIA, A.; EDDY, R.; ABRAHAM, J.A.; FIDDES, J.C. & SHOWS, T.B. (1986). The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 644 - 651.

MOSCATELLI, D.; PRESTA, M. & RIFKIN, D. (1986). Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 2091 - 2095.

NEUFELD, G.; MITCHELL, R.; PONTE, P. & GOSPODAROWICZ, D. (1988). Expression of human basic fibroblast growth factor cDNA in baby hamster kidney-derived cells results in autonomous cell growth. *J. Cell Biol.*, 106: 1385 - 1394.

OKUMURA, T.; UEHARA, A.; TSUJI, K.; TANIGUCHI, Y.; KITAMORI, S.; SHIBATA, Y.; OKAMURA, K.; TAKASUGI, Y. & NAMIKI, M. (1991). Central nervous system action of basic fibroblast growth factor: inhibition of gastric acid and pepsin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175: 527 - 531.

PLATA-SALAMAN, C.R. (1988). Food intake suppression by growth factors and platelet peptides by direct action in the central nervous system. *Neurosci. Lett.*, 94: 161 - 166.

PRATS, H.; KAGHAD, M.; PRATZ, A.C.; KLAGSBRUN, M.; LELIAS, J.M.; LIAUZUN, P.; CHALON, P.; TAUBER, J.P.; AMALRIC, F.; SMITH, J.A. & CAPUT, D. (1989). High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1836 - 1840.

PRESTA, M.; MOSCATELLI, D.; JOSEPH-SILVERSTEIN, J. & RIFKIN, D.B. (1986). Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 4060 - 4066.

ROBINSON, C.J. (1991). Tailoring and targeting fibroblast growth factors. *Trends Biotechnol.*, 9: 147 - 148.

ROGELJ, S.; WEINBERG, R.A.; FANNING, P. & KLAGSBRUN, M. (1988). Basic fibroblast growth factor fused to a signal peptide transforms cells. *Nature (London)*, 331: 173 - 175.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS T. (1989). - **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, New York.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463 - 5467.
- SASADA, R.; KUROKAWA, T.; IWANE, M. & IGARASHI, K. (1988). Transformation of mouse Balb/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 588 - 594.
- SCHREIBER, A.B.; KENNEY, J.; KOWALSKI, W.J.; FRIESEL, R.; MEHLMAN, T. & MACIAG, T. (1985). Interaction of endothelial cell growth factor with heparin: characterization by receptor and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6138 - 6142.
- SEND, M.; SASADA, R.; KUROKAWA, T. & IGARASHI, K. (1990). Carboxyl-terminal structure of basic fibroblast growth factor significantly contributes to its affinity for heparin. *Eur. J. Biochem.*, **188**: 239 - 245.
- SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. & MOORE, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**: 1190 - 1206.
- SPORN, M.B. & ROBERTS, A.B. (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature (London)*, **332**: 217 - 219.
- SQUIRES, C.H.; CHILDS, J.; EISENBERG, S.P.; POLVERINI, P.J. & SOMMER, A. (1988). Production and characterization of human basic fibroblast growth factor from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **263**: 16297 - 16302.
- STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J. & DUBENDORFF, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**: 60 - 89.
- THOMAS, K.A.; RILEY, M.C.; LEMMON, S.K.; BAGLAN, N.C. & BRADSHAW, R.A. (1980). Brain fibroblast growth factor: Non-identity with myelin basic protein fragments. *J. Biol. Chem.*, **255**: 5517 - 5520.
- THOMAS, K.A.; RIOS-CANDELORE, M. & FITZPATRICK, S. (1984). Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 357 - 361.

- THOMPSON, S.A.; PROTTER, A.A.; BITTING, L.; FIDDES, J.C. & ABRAHAM, J.A. (1991). Cloning, Recombinant Expression, and Characterization of Basic Fibroblast Growth Factor. *Methods Enzymol.*, 198: 96 - 116.
- TOGARI, A.; BACKER, D.; DICKENS, G. & GURROFF, G. (1983). The neurite promoting effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 1189 - 1193.
- UENO, N.; BAIRD, A.; ESCH, F.; LING, N. & GUILLEMIN, R. (1986). Isolation of an amino terminal extended form of basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 580 - 588.
- WATANABE, T.; SENO, M.; SASADA, R. & IGARASHI, K. (1990). Molecular characterization of recombinant human acidic fibroblast growth factor produced in *E. coli*: comparative studies with human basic fibroblast growth factor. *Mol. Endocrinol.*, 4: 869 - 879.
- YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. & MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33: 103 - 119.
- YAYON, A.; KLAGSBRUN, M.; ESKO, J.D.; LEDER, P. & ORNITZ, D.M. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 64: 841 - 848.