

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GILSON MASAHIRO MURATA

**FGF2 de 18kDa e de 22,5kDa: sinalização
molecular parácrina e funções biológicas**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
12/02/2010

GILSON MASAHIRO MURATA

**FGF2 de 18kDa e de 22,5kDa: sinalização
molecular parácrina e funções biológicas**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin
Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista*

São Paulo
2010

Gilson Masahiro Murata

FGF2 de 18kDa e de 22,5kDa: sinalização molecular parácrina e funções biológicas

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

**Aos meus pais que me introduziram no
caminho do conhecimento: das curiosidades
e perguntas aos livros...**

Agradecimentos

Primeiro, agradeço a Deus pelo privilégio de ter, através da ciência, um vislumbre da sua infinitude.

Ao Prof. Hugo Aguirre Armelin. Obrigado pela orientação, não somente em assuntos científicos, mas também assuntos pessoais; pela amizade, paciência e por ser exemplo de alguém que ama o conhecimento e está continuamente aprendendo. Quando não sabe profundamente um assunto, recorre aos livros e artigos para aumentar seu grande conhecimento.

Ao Prof. Maurício Silva, pela co-orientação e me aceitar como um dos seus alunos, neste período de 2 anos.

Ao “Doutor Dermargos”, companheiro de bancada, conversas etc. Muito obrigado por seus conselhos, amizade e apoio nos meus momentos mais difíceis... Também por dividir sempre a bancada comigo, dois espaçosos ocupantes na mesma bancada não foi fácil!

Aos colegas de Laboratório (Cecília, Jac, Edu, Dr. Nakano, Ivan, Ju Galvão, Ju Dias, Matheus, Mari e Nathany) pela amizade e apoio nestes últimos anos. Aos que passaram pelo laboratório: à minha vizinha preferida (Tati), ETC e Paula, Carlinha e Celina: obrigado por fazerem parte da minha história.

Aos colegas vizinhos: Marcelão, Susan e demais membros e os não mais presentes Margot, Camila, Aurélio do laboratório da Profa. Bianca Zingales; Márcia, Dani, Juliana e Rafa, sem deixar de citar a Profa. Carla Columbano; ao Foca, Cleber, Kátia mineira e Kátia Japonesa, do laboratório do prof. Alexander Henning: Muito obrigado pelas sugestões, uso de aparelhos, empréstimo de reagentes etc.

A Cíntia Kawai, pela amizade, além das dicas e apoio nos experimentos de SPR no laboratório do Prof. Maurício.

A tia Rume e Nozomu que me acolheram assim que chegado do interior (caipira de tudo) para a cidade grande... Obrigado mesmo!

Aos meus amigos de São José dos Campos, que tem sido a minha segunda família. Agradecimento especial à família Tanaami (Rui, Kazumi, Rubem, Milca e Neca) que me adotaram e receberam na sua casa de braços abertos.

Aos amigos republicanos (King, Killer, Jun, GLS, Fê, Bisnaga, Jojima, Jorge-san, Hue etc) por me agüentarem no meu período TPT (Tensão Pré Tese)...

Especialmente a Karen que mesmo sem entender nada de bioquímica, sempre esteve atenta e disposta a me ajudar. Obrigado por sempre me apoiar e acreditar em mim.

Aos tios Lourenço e Toyo por cuidarem de mim como filho, com atenção e carinho.

Aos amigos da SS por acreditarem também e serem minha “grande família” em São Paulo.

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio e carinho... Por me agüentarem nos momentos mais difíceis dessa caminhada...

Este projeto teve o suporte financeiro da FAPESP e CNPq.

“Quanto mais aprendemos sobre o mundo, quanto mais profundo nosso conhecimento, mais específico, consistente e articulado será nosso conhecimento do que ignoramos – o conhecimento da nossa ignorância. Essa, com efeito, é a principal fonte da nossa ignorância: o fato de que nosso conhecimento só pode ser finito, mas nossa ignorância deve necessariamente ser infinita. [...] Vale a pena lembrar que, embora haja uma vasta diferença entre nós no que diz respeito aos fragmentos que conhecemos, somos todos iguais no infinito da nossa ignorância.”

Karl Popper

“O que distingue um cientista de um não cientista é o fato de que o primeiro confessa imediatamente a própria ignorância. De fato, só à base dela é que surge seu desejo de conhecer. Se soubesse tudo não se colocaria nenhuma pergunta, não daria início à pesquisa nenhuma”.

Heinz Von Foerster

Resumo

Murata, G.M. **FGF2 de 18kDa e de 22,5kDa: sinalização molecular parácrina e funções biológicas.** 2010. 104p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), o fundador da família FGF, tem funções regulatórias na mitogênese, diferenciação, morfogênese e reparo tecidual. Diversas espécies moleculares de FGF2 compartilham uma seqüência C-terminal comum de 155 aminoácidos, pois se originam de diferentes sítios de iniciação de leitura de um único mRNA. O menor, o FGF2-18kDa, é liberado extracelularmente para se ligar a receptores específicos (FGFRs) para disparar as funções parácrinas e autócrinas pelas quais este fator é conhecido. Por outro lado, as espécies maiores (FGF2-21, 22, 22,5 e 34kDa) são intracelulares se ligam a parceiros moleculares desconhecidos para exercer funções intrácrinas ainda indefinidas. O objetivo desta tese foi produzir espécies recombinantes do FGF2-18 e FGF2-22,5, na forma de proteínas de fusão, para analisar funções biológicas e mecanismos de sinalização. Nas células malignas Y1 de camundongo, os recombinantes de FGF2-18kDa (FGF2-18, His-FGF2-18 e His-FGF2-18-ProA) dispararam uma resposta antagônica estimulando as vias de sinalização mitogênica, mas bloqueando o ciclo celular. Nos fibroblastos não tumorigênicos Balb3T3, estes mesmos recombinantes de FGF2-18kDa dispararam apenas a resposta mitogênica clássica. Todos os efeitos biológicos destes recombinantes de FGF2-18kDa foram bloqueados pelo inibidor específico da proteína quinase de tirosina dos FGFRs, PD173074, demonstrando que são respostas intermediadas pelos FGFRs. Portanto, os domínios estruturais adicionados aos recombinantes de FGF2-18kDa não impediram que estas proteínas se ligassem e ativassem os FGFRs. Por outro lado, o recombinante His-FGF2-22,5 dispara apenas as vias de sinalização mitogênica em ambas as células Y1 e 3T3, mas este efeito biológico não é inibido por PD173074. Estes resultados sugerem que a seqüência N-terminal de 55 resíduos, rica em aminoácidos básicos, impede que o FGF2-22,5kDa se ligue e/ou ative os FGFRs. Entretanto, o recombinante His-FGF2-22,5ProA dispara a resposta antagônica característica do FGF2-18kDa. As implicações destes últimos resultados é que o domínio de ProA adicionado ao C-terminal torna o FGF2-22,5kDa um bom ligante dos FGFRs. A interação física entre ligante e receptor das formas recombinantes His-FGF2-18kDa (ou His-FGF2-18ProA) e FGF2-22,5kDa com os putativos FGFRs foi analisada através da técnica de SPR e os resultados mostram K_D s aproximados ($K_{D18}=21, 488.10^{-9}$ e $K_{D22,5}=20,70393.10^{-9}$), enquanto que o número de sítios ligantes em vesículas microsomais das células é significativamente inferior para o FGF2-22,5kDa. Estes resultados são compatíveis com a existência de receptores diferentes para FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa, uma hipótese ainda a ser definitivamente corroborada. Em conclusão, o FGF2-18kDa, mesmo em formas recombinantes como proteína de fusão, dispara todos os efeitos biológicos descritos para FGF2, através dos FGFRs. Diferentemente, o FGF2-22,5kDa, como fator parácrino, só desencadeou a resposta mitogênica clássica de FGF2, provavelmente através de receptores diferentes dos FGFRs. Os resultados e conclusões desta tese têm um potencial indiscutivelmente relevante para a biologia molecular do câncer, com implicações possíveis em terapia oncológica.

Palavras-chave: FGF, FGF-2, estrutura e função de proteínas, proteínas recombinantes, proliferação celular, Ressonância Plasmônica de Superfície.

Abstract

Murata, G.M. **FGF2 species of 18 and 22.5 kDa: paracrine molecular signaling and biological functions.** 2010. 104p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), the founder of the FGF family, has regulatory functions in mitogenesis, differentiation, morphogenesis and tissue repair. Multiple FGF2 molecular species, sharing a C-terminal sequence of 155 amino acids, are translated from different initiation sites of the same mRNA. The smaller, the FGF2-18kD, is extracellularly released to bind to specific membrane receptors (FGFRs), performing paracrine and autocrine functions. On the other hand, the larger FGF2s (21, 22, 22.5 and 34kDa) are intracellular species that bind to unknown partners to play still undefined intracrine roles. The aim of this thesis was to produce recombinant species of FGF2-18kDa and FGF2-22,5kDa, in the form of fusion proteins, to analyze functions and signaling mechanisms. In mouse Y1 malignant cells, FGF2-18kD recombinants (FGF2-18kDa and His-FGF2-18kDaProA) triggered an antagonistic response activating mitogenic signaling pathways, but blocking the cell cycle. However, in non tumorigenic Balb3T3 fibroblasts, these same FGF2-18kD recombinants only elicited the classical mitogenic response. All biological effects of these FGF2-18kD recombinants were blocked by the specific inhibitor of FGFR-protein-tyrosine-kinases, PD173074, demonstrating that these responses are mediated by FGFRs. Therefore, the new peptide domains added to FGF2-18kD did not prevent these recombinant fusion proteins to bind and activate FGFRs. Conversely, the recombinant His-FGF2-22,5kDa triggered only mitogenic signaling pathways in both Y1 and Balb3T3 cells, a biological effect not inhibited by PD173074. These results suggested that the additional basic-rich N-terminal sequence of 55 amino acid residues, found in FGF2-22,5kDa, prevents this FGF2 species from binding and / or activate FGFRs. However, surprisingly, the recombinant His-FGF2-22kDaProA triggered the antagonistic response characteristic of FGF2-18kDa. These results imply that the ProA-domain added to the C-terminal end rendered the FGF2-22,5kDaProA a good ligand of FGFRs. The physical interaction between recombinants of both His-FGF2-18kD and His-FGF2-22kDa with putative FGFRs, analyzed by SPR, yielded close K_D values ($K_{D18} = 21,5 \cdot 10^{-9}$ and $K_{D22,5} = 20,7 \cdot 10^{-9}$), while the number of binding sites in cell microsomal vesicles were significantly lower for the His-FGF2-22,5kDa. These results are consistent with the existence of different receptors for FGF2 and FGF2-18kD-22,5kDa, a hypothesis that has yet to be definitively confirmed. In conclusion, FGF2-18kD, even as recombinant fusion proteins, triggered all biological effects of FGF2, through FGFRs. Conversely, the FGF2-22, 5kDa only triggered the classical mitogenic response, probably via receptors other than FGFRs. The results and conclusions of this thesis are potentially of great interest in cancer molecular biology, with implications in oncologic therapy.

Keywords: FGF, FGF-2, structure and function of proteins, recombinant proteins, cell proliferation , Surface Plasmon resonance (SPR)

Lista de Abreviaturas e Siglas

BrdU	Bromodeoxiuridina
4-OHT	4-hidroxitamoxifen
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico ou Adrenocorticotropina
AKT ou PKB	Proteína kinase B
cDNA	DNA complementar
DMEM	“Dulbeco modified Eagle medium”
DTT	ditiotretitol
ECM	Matrix Extracelular, do inglês “Extracellular Matrix”
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FACS	Análise de citometria de fluxo, FACS, do inglês: Fluorescent Activated Cell Sorting
FCS	Soro fetal bovino, do inglês: Fetal calf serum
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	Receptores específicos para FGF
FPLC	Cromatografia de proteína em fase líquida, do inglês “Fast protein liquid chromatography”
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HBM	Bicamada híbrida de membrana, do inglês “Hybrid Bilayer Membrane”
HS	Heparan Sulfato
HSPG	Heparan-sulfato proteoglicana
IFN	Interferon
IPTG	“Isopropil-thiogalactoside”
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
MOPS	Ácido 3-(N-morpholino) propanesulfônico
NAC	N-acetil-L-cisteína
NLS	Sequencia de localização nuclear, do inglês “Nuclear Localisation Sequence”
ORF	Abertura de fases de leitura, do inglês “Open reading frame”
p53	Proteína repressora p53
PBS	Solução salina tamponada
PBSA	Solução salina tamponada sem Ca ⁺² sem Mg ⁺²
PCR	Reação de polimerase em cadeia, do inglês “Polimerase Chain Reaction”
pERK	ERK fosforilada (ativa)
PI	Iodeto de propídio; PI, do inglês: “propidium iodide”
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Kinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C

PLC	“Fosfolipase-C”
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetate, éster de forbol
PMSF	Fenilmetano Sulfonil Fluoreto
Ras	“Rat Sarcoma Virus”
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio; ROS, do inglês: reactive oxygen species.
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS PAGE	Gel de eletroforese de poliacrilamida-SDS, do inglês “SDS-polyacrilamide gel electrophoresis”
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície, do inglês: Surface Plasmon Resonance
TBST	Tampão Tris-Base, ácido bórico e tween-20
TCA	Ácido tricloro acético

Índice

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Família dos FGFs	19
1.2. O FGF2.....	21
1.3. Receptores de FGFs	24
1.3.1. Heparan sulfato proteoglicanas (HSPG)	25
1.3.2. Receptores de Fibroblast Growth Factor (FGFRs).....	27
1.4. Proteínas recombinantes	28
1.5. Ciclo Celular	29
1.6. SPR – Surface Plasmon Resonance (Ressonância de Plasma de Superfície) ...	31
1.6.1 Bases teóricas na detecção por SPR.....	31
1.6.1.1. Reflexão total e Ângulo crítico	31
1.6.1.2 - Filmes finos de fosfolípidos – monocamadas e bicamadas.....	34
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivo geral	39
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1. Materiais	44
3.1.1 Linhagens celulares	44
3.1.2. Bactérias	45
3.1.3 - Plasmídeos	45
3.1.4- Meios de cultura.....	46
3.1.5- Coluna de cromatografia e resinas	46
3.1.6- Anticorpos comerciais	46
3.1.7 - Kits	47
3.1.8 - Enzimas	47
3.1.9 - Soluções	48
3.1.10- Reagentes.....	48
3.1.11 - Equipamentos:	49
3.2 - Métodos	50
3.2.1. Cultura de células.....	50
3.2.2- Carenciamento celular	50
3.2.3- Transformação de bactérias.....	51
3.2.4 - Preparação de DNA plasmidial	51
3.2.5- Amplificação de fragmentos por Polimerase Chain Reaction (PCR)	51
3.2.6- Digestão e clonagem dos plasmídeos	52
3.2.7- Sequenciamento	52
3.2.8- Expressão de proteínas em <i>E.coli</i>	53
3.2.8.1- Expressão em baixa escala.....	53
3.2.8.2- Expressão em alta escala.....	54
3.2.9 - Purificação de proteínas	55
3.2.9.1 - Purificação por beads de Ni NTA.....	55

3.2.9.2 - Purificação de proteínas por cromatografia de fase líquida (FPLC) .	55
3.2.10- Análise de expressão de proteínas:	56
3.2.10.1. SDS-PAGE	56
3.2.10.2 - Coloração de gel de poliacrilamida com Coomassie-Blue.....	56
3.2.10.3.. Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata	57
3.2.10.4- Análise de proteínas por Western Blot:.....	57
3.2.11 - Extração de proteínas celulares	58
3.2.12 - Ensaio clonogênico	59
3.2.13- Ensaio de Imunocitoquímica	59
3.2.14- Preparação das membranas biológicas por centrifugação diferencial ...	60
3.2.14 - Funcionalização do prisma.....	60
3.2.15 - Cinética de ligação.....	61
3.2.16- SPR – Fórmulas utilizadas nos cálculos das espessuras e quantidades de material adsorvido no HBM, através da técnica de Ressonância de Plasma de Superfície.....	63
4. RESULTADOS	65
4.1. Produção de espécies recombinantes de FGF2-18kDa e FGF2-225kDa, na forma de proteínas de fusão: problemas de isolamento e caracterização.	66
4.1.1. Estratégia de clonagem das seqüências codificantes de FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa e suas fusões	66
4.2. Atividade biológica das formas recombinantes de FGF2-18kDa e His-FGF2-22,5kDa	75
4.2.1 Os recombinantes His-FGF2-18kDa ProA e His-FGF2-22,5 ProA disparam vias antagônicas nas células malignas Y1 dependentes do oncogene k-ras; iniciando vias de sinalização mitogênica e bloqueando o ciclo celular na fase S. Mas o recombinante His-FGF2-22,5kDa dispara apenas vias mitogênicas.	75
4.2.1.1- Os recombinantes His-FGF2-18kDa ProA, His-FGF2-22,5kDa ProA e His FGF2-22,5kDa ativam ERK e induzem o gene c-fos.....	75
4.2.2- O His-FGF2-22,5kDa Proa, mas não o His-FGF2-22,5kDa, bloqueia a proliferação celular como FGF18kDa e His FGF2-18kDa ProA	78
4.2.2.1- Ensaio Clonogênico.....	78
4.2.2.2- Análise de atividade biológica de His-FGF2-22,5kDa ProA, através do ensaio clonogênico	80
4.2.2.3- Curvas de crescimento mostram que FGF2-18KDA inibe proliferação em células Y1 e His-FGF2-22,5KDA protege as células deste efeito inibitório.	81
4.2.2.4- Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-18kDa-ProA - Indução de síntese de DNA, pela incorporação de timidina tritiada.....	83
4.2.3- O His-FGF2-22,5kDa age por mecanismo independente de receptor de FGF	84
4.3- Análise de interação física entre FGF2 recombinantes e receptores através de ressonância plasmônica de superfície	86
4.3.1 - Construção de biosensores- diferentes formas de funcionalização mostram a formação de Bcamada Híbrida (HBM) e Bcamada Lipídica suportada em substrato sólido	86
4.3.2- O Biosensor HBM parece apresentar dois sítios de ligação.	89
4.3.3- Curvas de associação de FGF2-18kDa e His-FGF2-22,5kDa mostram diferenças na ligação ao HBM biosensor	91

5. DISCUSSÃO	94
5.0 Considerações preliminares.	95
5.1. Produção das isoformas recombinantes de FGF2: problemas e soluções.	96
5.2- As proteínas O His-FGF2-22,5kDa ProA, His-FGF2-22,5kDa, FGF18kDa e His FGF2-18kDa ProA disparam vias mitogênicas em células Y1, através da fosforilação de ERK1/2, indução de síntese de c-FOS e proliferação celular através de curvas de crescimento.....	97
5.3. Interação física entre as isoformas recombinantes de FGF2 e receptores putativos: relevância biológica e limitações da abordagem por SPR.....	100
6. CONCLUSÕES.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	104
SÚMULA CURRICULAR	111

Índice de Figuras

Figura 1.1 Família dos FGFs.....	19
Figura 1.2 – O FGF2 e suas isoformas.....	21
Figura 1.3 – Estrutura cristal de diferentes FGFs.....	23
Figura 1.4 – Estrutura cristal da interação do FGF2.....	24
Figura 1.5 – Representação esquemática do receptor de FGF.....	27
Figura 1.6 – Representação esquemática da luz incidindo em um ponto. Quando o ângulo de incidência da luz é menor do que o ângulo crítico, ocorre refração da luz incidente.....	32
Figura 1.7 - Representação da geração de plasmons de superfície.....	32
Figura 1.8 Esquema de Bicamada Lipídica Plana	34
Figura 1.9 - Diagrama esquemático de uma bicamada em suporte sólido. A membrana é separada do substrato por uma fina camada (~10 a 20Å) de água. (Figura retirada de Castellana & Cremer, 2006)	35
Figura 1.10 - Ilustração esquemática de uma bicamada híbrida.	36
Figura 1.11 - Esquema do possível mecanismo para formação de monocamada lipídica sobre prisma	36
Figura 1.12 – Diagrama esquemático da bicamada suportada por polímero Domínios periféricos de proteínas transmembranares podem ser imobilizadas e desnaturadas em contato com o metal. Uma camada de polímero protege a proteína do contato ao metal. (Figura retirada de Castellana & Cremmer, 2006)	37
Figura 2.1 - Modelagem da interação do FGF2-22,5kDa aos domínios de ligação do FGFR.....	39
Figura 3.1 - Imagens geradas pelo SPRi durante a formação do HBM e cinética de associação do FGF2 ao biosensor	61
Figura 3.2 – Cinética de ligação do FGF2 ao biosensor.....	62
Figura 4.1 –Esquema geral da construção das proteínas recombinantes. 67	
Figura 4.2. Purificação por cromatografia de afinidade de His-FGF2-18kDa ProA em coluna His Trap.	69
Figura 4.3 Purificação da proteína His-FGF2-22,5kD ProA de extratos celulares de <i>E.coli</i>.	70
Figura 4.4. Produção e Purificação da proteína recombinante de His-FGF2 de 22,5kDa em <i>E.coli</i>, cepa DH10B em coluna His Trap.....	71
Figura 4.5. Indução de <i>E.coli</i> DH10B em diferentes temperaturas e concentrações.....	73
Figura 4.6. Indução de His-FGF2 de 22,5kDa em <i>E.coli</i>, Arctic em coluna His Trap	74
Figura 4.7. Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-18kDa-ProA	76
Figura 4.8 - Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-22,5kDa-ProA.....	77
Figura 4.9: Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-22,5kDa:	78

Figura 4.10: Atividade anti-mitótica de His-FGF2-18kDa ProA através de ensaio clonogênico	79
Figura 4.11: Teste de atividade biológica das frações eluídas de His-FGF2-22,5kDa ProA de 22,5kDa	81
Figure 4.12. FGF2-18kDa inibe a proliferação em células Y1 in vitro, mas His-FGF2-22,5kDa protege as células	82
Figura 4.13: Análise de atividade biológica das frações eluídas de FGF2 de 22,5kDa	83
Figura 4.14 Incorporação relativa de timidina tritiada.....	84
Figura 4.15: Inibidor da quinase do receptor de FGF, PD 173074, não bloqueia atividade de His-FGF2-22,5kDa	85
Figura 4.16: Construção de biosensors com diferentes substratos.....	87
Figura 4.17 Curva de associação FGF2 em biosensores formados por diferentes substratos	88
Figura 4.18 Curva de associação FGF2-HBM.	90
Figura 4.19 – Hipótese de interação do FGF2 à membrana biológica.....	91
Figura 4.20 Curva de associação FGF2-HBM.	932
Figura 5.1- Comparação entre as estruturas do FGF2-18kDa e o FGF2-22,5kDa	99

Índice de Tabelas

Tabela 4.1 – Tabela geral dos tamanhos dos fragmentos de cDNA (BP) e dos pesos moleculares das proteínas de fusão.	67
Tabela 4.2 – Tabela de rendimento das purificações das proteínas recombinantes em <i>E.coli</i>	72
Tabela 4.3 Tabela de rendimentos, estabilidade e pI das proteínas recombinantes purificadas a partir de extratos de <i>E.coli</i>	73
Tabela 4.4- Tabela de atividade biológica em células Y1 disparada pelas proteínas recombinantes.....	85
Tabela 4.5 – Comparação das constantes de afinidade obtidas por diferentes métodos.	91

1. INTRODUÇÃO

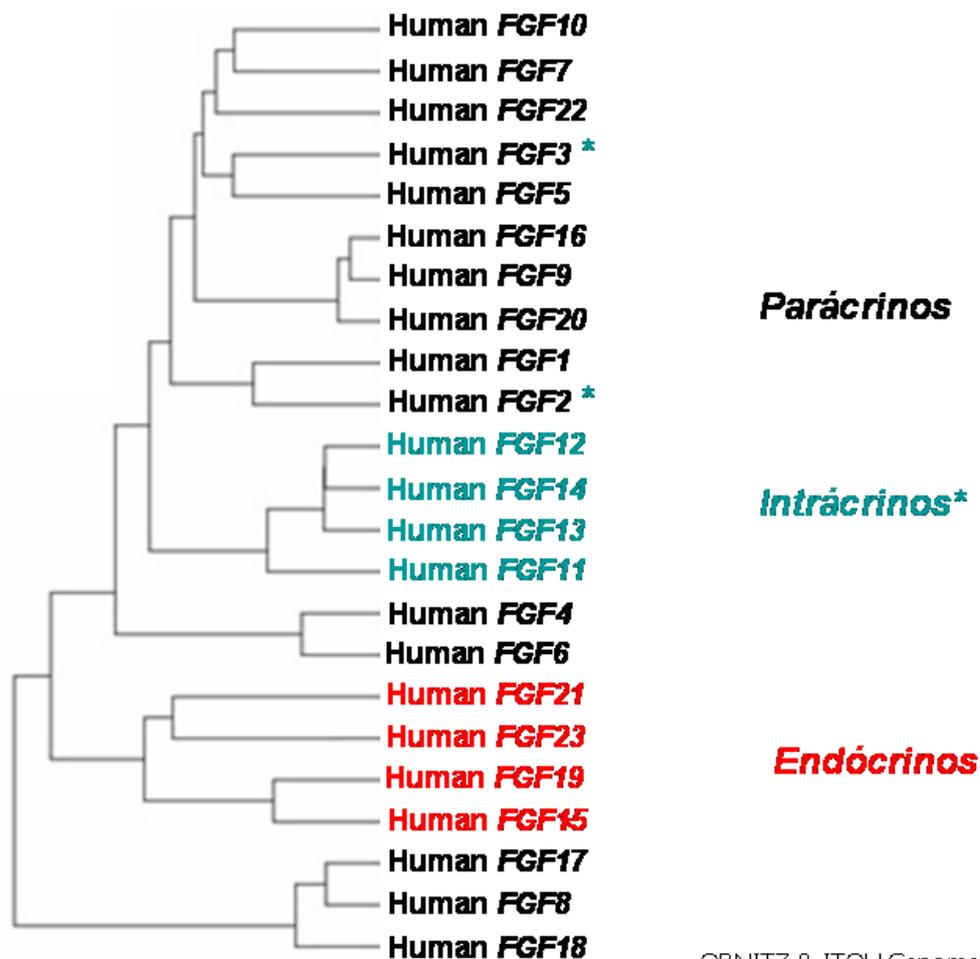
1.1. Família dos FGFs

Os FGFs (do inglês “Fibroblast Growth Factor”, ou fatores de crescimento de fibroblastos) compreendem uma família de 24 proteínas, com massa molecular variando de 17 a 34 kDa e 13 a 71% de identidade na estrutura primária. Foram inicialmente caracterizados como promotores de crescimento e divisão celular, mas atualmente são reconhecidos pelo seu papel central em diversos fenômenos biológicos, tais como desenvolvimento (YAMAGUCHI & ROSSANT, 1995), proliferação, organogênese, diferenciação celular, migração (ARMELIN, 1973 e GOSPODAROWICZ et al., 1978 e 1986), cicatrização de feridas (CLARKE, 1993 e CUEVAS et al., 1988) e angiogênese (BASILICO & MOSCATELLI, 1992). Os FGFs são expressos em uma grande variedade de organismos (de invertebrados a vertebrados superiores), nos mais diversos estágios do desenvolvimento (embrião, feto e tecido adulto), mas não foram encontrados em eucariotos unicelulares (ITOH & ORNITZ, 2004).

Os FGFs apresentam uma região central similar com 24 resíduos de aminoácidos altamente conservados e 6 resíduos idênticos, destes mesmos 24 resíduos, 10 resíduos são essenciais para a interação com o receptor (FGFR). Há também duas cisteínas conservadas que não participam de pontes de dissulfeto, mas que podem ter papel fundamental na estruturação da proteína (RIFKIN & MOSCATELLI, 1989; GALZIE et al., 1997). Outra característica comum a esta família de proteínas é uma alta afinidade por heparan sulfato (HS) e proteoglicanos sulfatados (HSPG) (BURGESS & MACIAG, 1989). Sabe-se que os proteoglicanos protegem os FGFs da degradação, além da sua participação essencial na ligação ao receptor (FGFR). A afinidade do FGF com a heparina foi e é bastante explorada,

principalmente nos processos de purificação dos FGFs por cromatografia de afinidade (SHING et al., 1984).

Quase todos os FGFs possuem um peptídeo sinal e são secretados pelas células, exercendo uma função parácrina ou endócrina, com as exceções do FGF1 e FGF2. Estes não possuem a seqüência sinal, mas são localizados na membrana basal da matriz extracelular e podem ser detectados no meio extracelular, sendo secretados por mecanismos ainda obscuros. Os FGF2 e FGF3 apresentam diversas isoformas de massas moleculares, traduzidas a partir de um mesmo mRNA (Figura 1.1)



ORNITZ & ITOH Genome Biology 2(3) 3005.1-12

Figura 1.1 Família dos FGFs. Os 24 membros são divididos em subfamílias com base na similaridade de seqüências e ação biológica. (Revisado em Ornitz & Itoh, 2000)

1.2. O FGF2

O FGF2, inicialmente denominado de bFGF (Fator de crescimento de fibroblastos básico), é o membro fundador da família FGF, originalmente encontrado através dos ensaios realizados por Armelin em 1973 demonstrando que extratos de hipófise bovina possuíam um fator de crescimento, de caráter básico e de natureza protéica, para fibroblastos de camundongo da linhagem 3T3 (Armelin, 1973). Depois de mais de 10 anos da sua descoberta é que a estrutura primária do FGF2 foi resolvida e seu respectivo cDNA foi clonado (ABRAHAM et al., 1986).

O FGF2 tem sido purificado de múltiplos órgãos, tais como cérebro, hipófise, rim, glândulas adrenais, corpo lúteo, placenta, retina, macrófagos, condrosarcoma e timo. Inicialmente o FGF-2 foi apresentado como um fator mitogênico agindo sobre fibroblastos 3T3 (ARMELIN, 1973; GOSPADAROWICZ, 1974; GOSPODAROWICZ & MORAN, 1974). Hoje o papel biológico atribuído ao FGF-2 é extenso: (i) participa da ativação neurotrópica; (ii) é um fator de sobrevivência celular; (iii) bloqueia a apoptose em células neuronais; (iv) é um potente agente angiogênico; (v) está envolvido na progressão tumoral e nas metástases (BASILICO & MOSCATELLI, 1992). O FGF-2 participa ativamente dos processos de desenvolvimento sendo um potencial regulador de genes e a sua expressão é suprimida por interferon alfa (IFN- α) e beta (IFN- β) (DINEY et al., 1998).

O gene *fgf2* foi mapeado no cromossomo 4, entre as bandas q26-q27, e consiste de três exons interrompidos por dois introns de 16kb que incluem grandes regiões 5' e 3' não codificantes. O exon 1 contém os sítios de início de tradução que levam à expressão das diferentes isoformas de FGF2 (Figura 1.2).

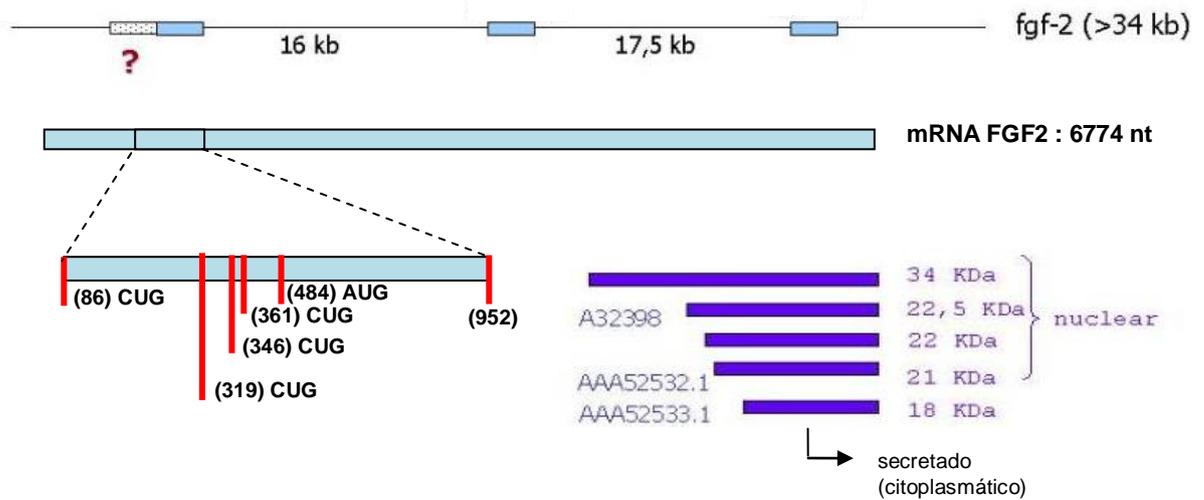


Figura 1.2 – O FGF2 e suas isoformas– O gene *fgf2* é formado por 3 éxons separados por 2 grandes introns (~17kb), que dá origem à um grande mRNA (~7kb), sendo destes uma grande região 5' e 3' não codificante, e a porção codificante (azul claro) que apresenta os sítios alternativos de início de tradução (CUG), dando origem às isoformas de massas moleculares diversas (34; 22,5; 22; 21 e 18 kDa), cuja porção carboxi terminal é comum a todas.

Existem 5 isoformas do FGF2 humano, as quais se originaram a partir de um único mRNA (PRATS et.al, 1989), resultantes de diferentes sítios de início de tradução. A isoforma de 18kDa, conhecida como de baixo peso molecular ou FGF2-18kDa, é traduzida a partir de um códon de iniciação convencional (AUG) e consiste de 155 aminoácidos, representando a seqüência comum a todas as isoformas de FGF2. Várias isoformas de altos pesos moleculares foram identificadas em muitas espécies animais, incluindo homem, rato, boi, porco e galinha. Essas isoformas de altos pesos moleculares são extensões do amino-terminal da isoforma de FGF2-18kDa e usam códons de iniciação CUG a montante do AUG. Em humanos, há quatro isoformas (21; 22; 22,5e 34kDa), que originariamente foram encontradas em células HeLa e permanecem sem função bem estabelecida; e em camundongo existem duas isoformas (21 e 22kDa). Há uma literatura que relata possíveis funções dos FGF2 de alto peso molecular, mas no geral são observações de natureza fenomenológica e não concordantes, as quais apresentamos a seguir.

Os FGF2 de alto peso molecular permitem as células NIH 3T3 sobreviverem em condições de baixo soro (ARESE et al, 1999 e ARNAUD et al., 1999). Outros autores relatam que estas formas de FGF2 induzem transformação celular, mas não migração, em fibroblastos, por processo independente da ativação dos FGFRs (BIKFALVI et al., 1995 e QUARTO et al., 1991).

As isoformas de altos pesos moleculares apresentam várias repetições GR (Glutamina-Arginina) que agem como uma seqüência de localização nuclear (*NLS – Nuclear Localisation Sequence*). A isoforma de 34kDa contém um NLS adicional rico em arginina, acima do NLS encontrado nas outras isoformas (SORENSEN et al., 2006). Diversos autores argumentam que o FGF2 de alto peso molecular tem a capacidade de se ligar à fração ribossomal e participar da regulação da expressão de todas as suas isoformas, através de uma alça de “feedback” (RENKO et al., 1990, BUGLER et al., 1991, QUARTO et al., 1991; RE, 2003; RE & COOK, 2006). Evidências recentes indicam que as isoformas de FGF2-18kDa e as de altos pesos moleculares não são sempre localizadas somente no citoplasma ou núcleo, respectivamente. A isoforma de 18kDa contém um NLS na porção C-terminal, responsável pela translocação da proteína para o núcleo, que é dependente de HSPG, pois tratamento com heparanase abole a internalização do FGF2 (HSIA et al., 2003). Quando o FGF2-18kDa se encontra no núcleo, há uma leve atividade estimulatória de proliferação celular e uma regulação negativa de seus receptores, sugerindo que há uma atividade biológica intracelular independente da via de sinalização pelos seus receptores (CHOI et al., 2000). Por outro lado, as isoformas de alto peso molecular podem ser liberadas da célula por vesículas (TAVERNA et al., 2003). O FGF2 não apresenta peptídeo sinal para a secreção via retículo endoplasmático (RE) e o uso de inibidores de secreção mediada por RE e

Golgi não afeta a liberação do FGF2 (ROTHMAN & WIELAND, 1996). O mecanismo pelo qual o FGF2 é liberado permanece incerto, mas estudos demonstram que a secreção é dependente da energia fornecida pelas Na⁺ K⁺ ATPases (FLORKIEWICZ et al., 1998) e que também há participação de vesículas intracelulares e da sua fusão a membrana plasmática (MIGNATTI et al., 1992).

A estrutura tridimensional de FGF2-18kDa foi determinada por vários grupos (ZHANG et al., 1991; ERIKSSON et al., 1991; ZHU et al., 1991). O “backbone” de FGF2 pode ser descrito como uma estrutura trigonal piramidal com 12 folhas β anti-paralelas (Figura 1.3). Uma α -hélice é identificada nos resíduos 131-136 (sítio de ligação ao receptor) e resíduos 13-30 que é uma parte do sítio de ligação ao heparan.(MOY et al., 1996 e FEIGE & BAIRD, 1989).

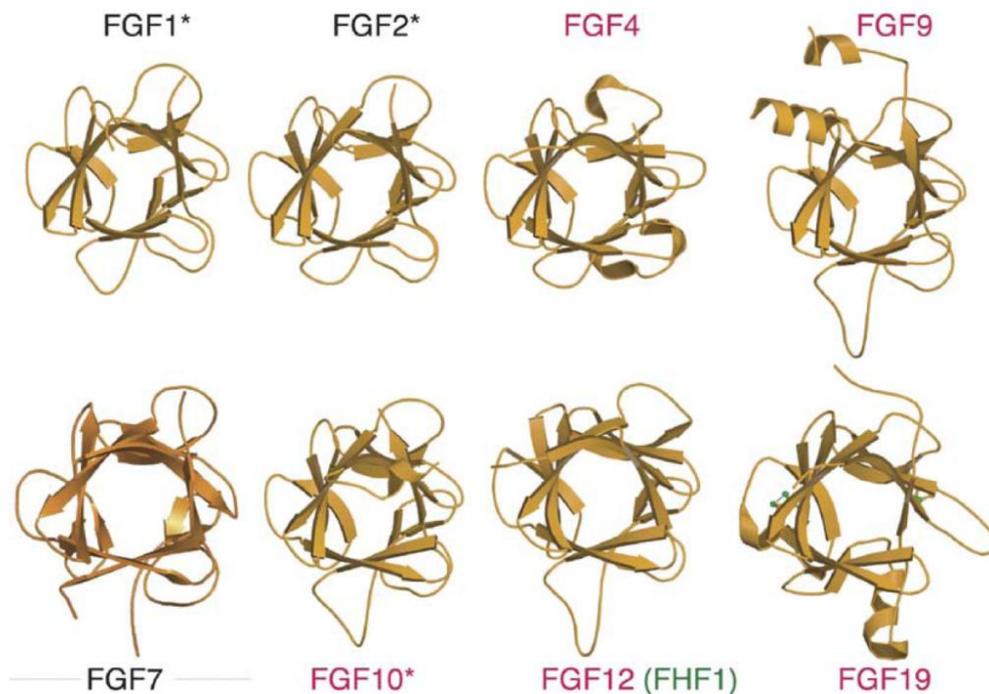


Figura 1.3 – Estrutura cristal de diferentes FGFs – A estrutura de diversos FGFs foram definidos através de cristalografia. O “backbone” dos FGFs é definido como uma estrutura trigonal piramidal com 12 folhas β anti-paralelas.

1.3. Receptores de FGFs

Atualmente acredita-se que os FGFRs são ativados através de um complexo ternário, cujos componentes são: o ligante FGF2, um segmento de cadeia de um heparan sulfato e um dos FGFRs (Plotnikov et.al, 2000) (Figura 1.4)

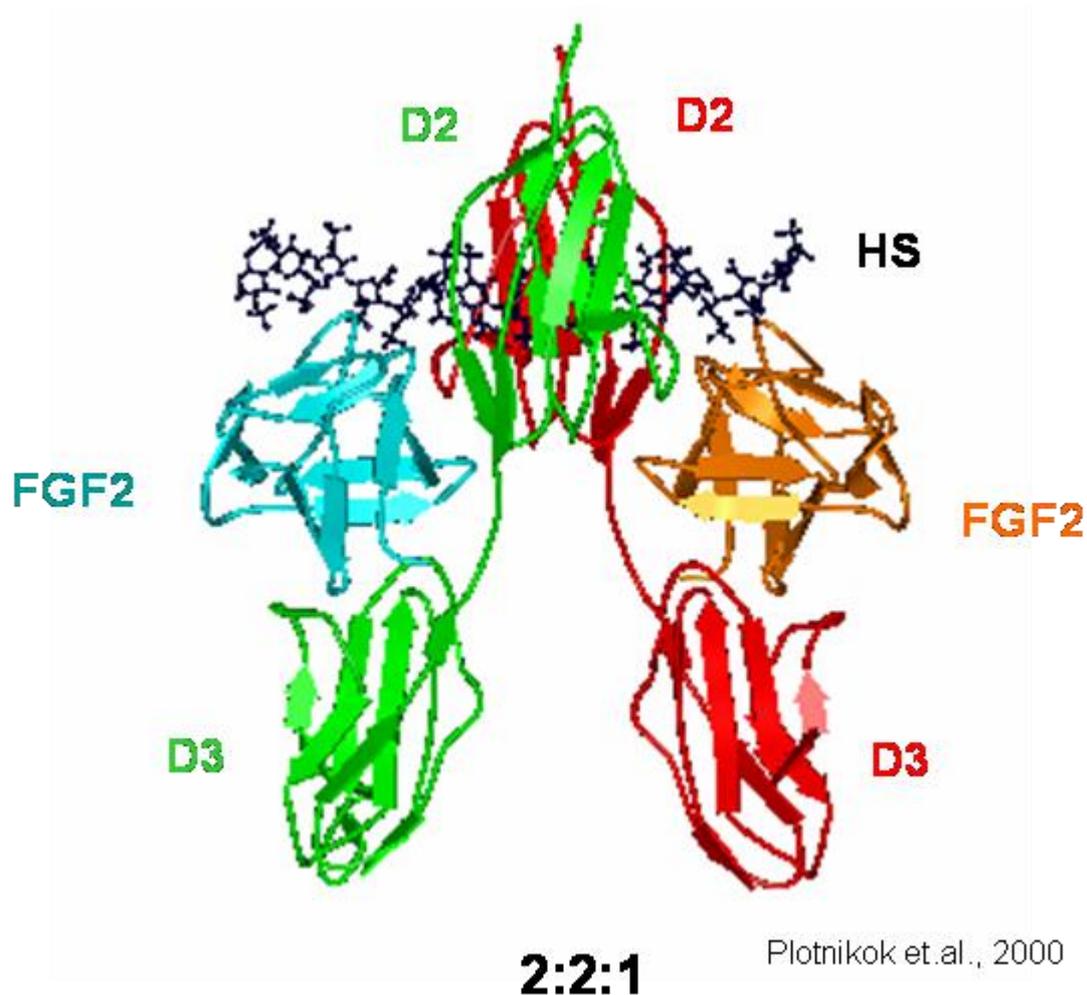


Figura 1.4 – Estrutura cristalina da interação do FGF2 – A estequiometria da ligação do FGF2 ao seu receptor foi definida como 2:2:1 a partir de estudos de interação do FGF2 (azul claro e laranja) aos domínios de ligação D2 e D3 do receptor (verde e vermelho) e heparan sulfato proteoglicanas (azul escuro).

1.3.1. Heparan sulfato proteoglicanas (HSPG)

Heparan sulfato proteoglicanas (HSPG) são macromoléculas localizadas na superfície celular e matriz extracelular (ECM), caracterizadas por um núcleo protéico ao qual se liga covalentemente uma única cadeia de glicosaminoglicana da classe dos heparan sulfatos (BERNFELD et al., 1999 e ESKO & SELLECK, 2002).

Heparina é encontrada dentro de vesículas de mastócitos em algumas espécies animais, enquanto heparan sulfato são encontrados na superfície celular de espécies de vertebrados e invertebrados. (NADER et al., 1987, 1999, DIETRICH et al. 1988)

Os HSPGs são classificados em famílias segundo a estrutura de seu núcleo protéico. Cinco classes de HSPG de superfície foram caracterizadas, incluindo: quatro isoformas de sindecan, quatro isoformas de glipican, perlecan, agrina e colágeno tipo XVIII (IOZZO, 2001). Glipicans e sindecans são proteoglicanas de membrana que se ligam à membrana plasmática através de, respectivamente, uma ligação glicosil fosfatidil inositol (GPI) ou um domínio transmembrana (BERNFELD, 1999). Muitos estudos sugerem que HSPGs estão envolvidos no controle do crescimento, adesão celular, metabolismo de lipoproteínas, coagulação sanguínea, sinalização de PKC e sinalização de fatores de crescimento, tais como EGF, Wnts e FGFs. Se aceita atualmente que cada ligante interage com seu HSPG específico através de domínios específicos. Por exemplo, Sindecan-1, 2 e 4 promovem alta afinidade de ligação do FGF2 aos seus receptores (SIMONS & HOROWITZ, 2001). GAMBARINI et al., 1993 mostrou que o tamanho da cadeia de HSPG interfere na atividade de aFGF em células 3T3, sugerindo a participação do HSPG na sinalização dos FGFRs ao aFGF. Além disso, os HSPGs também servem como sítios de estocagem e proteção do FGF2-18kDa contra proteólise.

1.3.2. Receptores de Fibroblast Growth Factor (FGFRs)

Os FGFRs são receptores transmembranares do tipo tirosina quinase compostos por; i) região extracelular caracterizada por três domínios consenso do tipo Imunoglobulina (Ig), que formam o sítio específico de ligação de FGF; ii) um espaço transmembranar e iii) um domínio citosólico de tirosina quinase ativado através do FGF ligante extracelular. Foram descobertos cinco genes distintos (*fgfr1-5*), cuja transcrição dá origem a múltiplos variantes estruturais devido à splicing alternativo (Figura 1.5).

Há evidências sugerindo que o domínio Ig I não é requerido para a ligação do FGF1 ou FGF2 ao FGFR. Além disso, existem “splicings” alternativos para o domínio Ig III, podendo formar duas isoformas, denominadas IIIb e IIIc (JAVE, 1992 e PASQUALE e SINGER, 1989). O FGFR1-IIIc, se liga ao FGF1 e FGF2 com igual afinidade (POWERS et al., 2000). Por outro lado, o FGFR1-IIIb possui maior afinidade por FGF2 (DUAN et al., 1992).

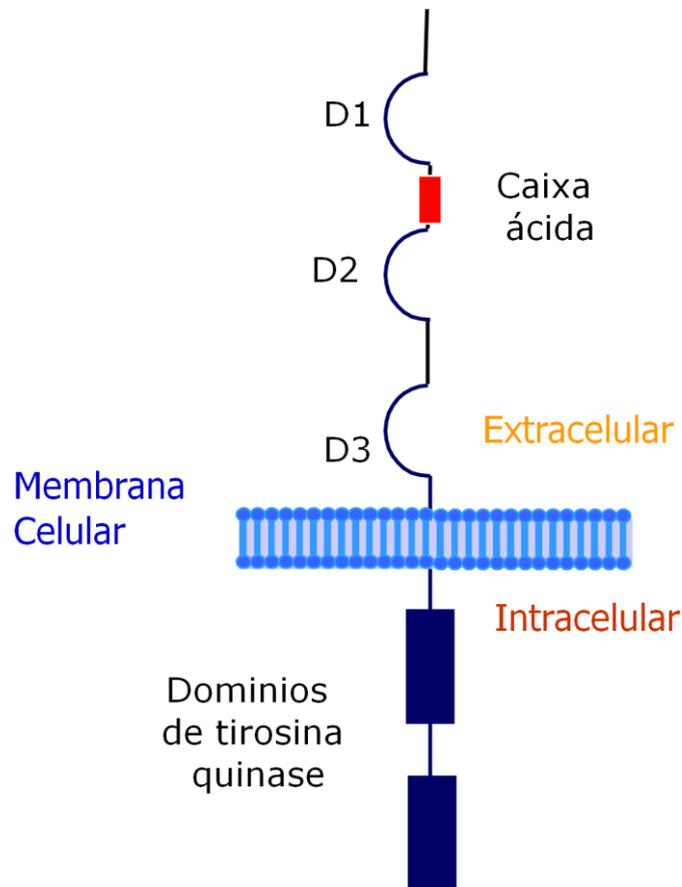


Figura 1.5 – Representação esquemática do receptor de FGF O FGFR contendo 3 domínios extracelulares tipo IgG, domínio transmembrana e 2 domínios intracelulares tipo tirosina quinase

1.4. Proteínas recombinantes

A expressão de genes heterólogos em microorganismos transformados tem sido uma técnica fundamental no desenvolvimento de pesquisas, envolvendo proteínas que biologicamente são pouco expressas. Há um grande número de opções de microorganismos hospedeiros para expressão de proteínas, entre eles a bactéria *E.coli* é a mais utilizada, pela simplicidade e baixo custo. No entanto, o uso de *E.coli* para a produção de proteínas recombinantes tem alguns problemas práticos. Por exemplo, *E.coli* não é o mais apropriado para a produção em larga escala de proteínas contendo pontes dissulfetos ou proteínas que requerem modificação pós traducional, além de que a estabilidade de proteínas

produzidas em *E.coli* pode ser baixa devido à degradação proteolítica e também, muitas vezes, serem produzidas na forma de corpos de inclusão (LEFEBVRE et.al., 2004).

Processos de produção em larga escala de proteínas recombinantes são influenciados por diversos fatores, tais como a estabilidade e o número de cópias do plasmídeo, a força do promotor, a estabilidade do mRNA, a eficiência de transcrição e tradução, a estabilidade e a solubilidade da proteína recombinante, a célula hospedeira e as condições de cultivo, como o meio de cultura utilizado e a temperatura de indução (SAWERS e JARSCH, 1996). Uma variedade de técnicas, incluindo o uso de diferentes promotores e cepas de bactérias modificadas com a co-expressão de chaperonas, mudanças nas condições de crescimento (diminuição da temperatura) e o uso de fusões com peptídeos altamente solúveis, tem sido empregadas para contornar esses problemas de solubilidade.

Estudos mostram que fatores como a temperatura, pH e quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura podem afetar na transcrição, tradução, atividade proteolítica, secreção, no rendimento e estabilidade das proteínas expressas em *E.coli* (LEE, 1996). Geralmente, qualquer característica que perturba a estabilidade das bactérias pode levar à agregação (UVERSKY & FINK, 2004).

1.5. Ciclo Celular

Ciclo celular é o conjunto de eventos finamente regulado pelo qual uma célula parental cresce, duplicando organelas, replicando o DNA com fidelidade

e separando os cromossomos com exatidão para dar origem a duas células filhas idênticas.

O ciclo celular é classicamente dividido em 4 fases: i) a fase de síntese de DNA (fase S) em que o genoma é replicado; ii) a fase M (M de mitose) onde os cromossomos são segregados e as células se preparam para a divisão celular final e as iii) fases G (*Gap* do inglês, intervalo) G1 e G2 são fases intermediárias de crescimento que preparam a célula para a fase S e M, respectivamente. As células também podem permanecer transitoriamente num estado quiescente comumente conhecido com G0.

Cabe ainda mencionar que a morte celular também envolve processos programados e altamente regulados, cujos mecanismos moleculares de controle e execução são hoje em dia bem conhecidos. Entre esses processos, os principais são apoptose e necrose (respectivamente revisados em KANDUC et al., 2002), aos quais estão estreitamente relacionados os processos de senescência e autofagia (respectivamente revisados em CRISTOFALO et al., 2004 e TSUJIMOTO & SHIMIZU, 2005).

1.6. SPR – Surface Plasmon Resonance (Ressonância de Plasma de Superfície)

Neste trabalho foi utilizada a técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície, ou simplesmente SPR (de *Surface Plasmon Resonance*), a qual vem despertando grande interesse no mundo acadêmico devido à possibilidade de caracterização em tempo real as interações entre biomoléculas e filmes finos, podendo obter as constantes de velocidade e de equilíbrio dessas associações e dissociações de biomoléculas e estimar a espessura de filmes finos.

1.6.1 Bases teóricas na detecção por SPR

1.6.1.1. Reflexão total e Ângulo crítico

Quando uma fonte de luz puntiforme é incidida perpendicularmente em uma interface do tipo ar-água, parte da luz é refletida e parte é refratada. O aumento do ângulo de incidência acarreta um aumento no ângulo de refração, que ao alcançar 90° indica uma refração tangente à superfície. O ângulo de incidência que provoca essa situação é denominado ângulo crítico. Para ângulos de incidência maiores que o ângulo crítico não se observa refração e toda a luz é refletida, gerando uma situação de reflexão interna total.

Quanto maior o índice de refração de um material transparente, menor o ângulo crítico. Depois que um feixe de luz entra em um material de índice de refração maior, só refrata se incidir, internamente, com um ângulo menor que o ângulo crítico (Figura 1.6, ângulo c, onde $a < b < c$).

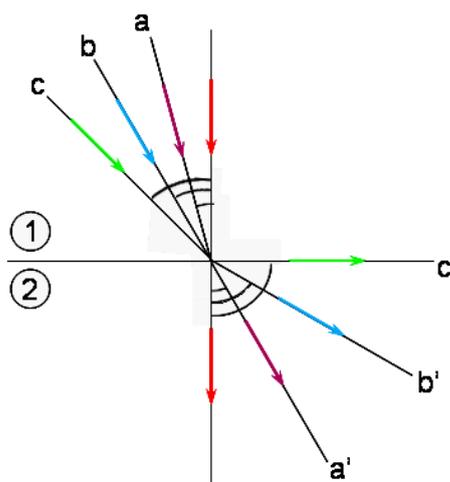


Figura 1.6 – Representação esquemática da luz incidindo em um ponto.

Quando o ângulo de incidência da luz é menor do que o ângulo crítico, ocorre refração da luz incidente.

Foi observado que quando uma luz passa de um material com um alto índice refrativo para outro de menor índice (p.ex. água), parte da luz é refletida na interface. Quando o ângulo de incidência (θ) atinge a interface é maior que o ângulo crítico (θ_c), a luz é completamente refletida (reflexão interna total). Se a superfície de vidro é revestida por uma fina camada de um metal nobre (p.ex. ouro), esta reflexão não é total; parte da luz é “perdida” dentro do filme metálico, consequência da oscilação de elétrons móveis (ou plasma) na superfície do filme metálico. Existe um segundo ângulo, maior que o ângulo crítico, chamado de ângulo SPR (θ_{SPR}), em que esta perda é maior e que a intensidade de luz refletida alcança um mínimo. Estas oscilações de elétrons móveis são chamadas ondas plasmônicas de superfície que se propagam na interface entre um metal, normalmente ouro ou prata (descrito em MAAROOFF et al., 2007), e um meio dielétrico. Estas ondas têm sido exploradas pela técnica de SPR, pois podem receber energia de uma radiação, geralmente, uma fonte de luz monocromática *p*-polarizada, energia que se propaga pela interface, cujo vetor do campo é máximo na superfície e decai exponencialmente com a distância (campo evanescente), podendo assim afetar e

monitorar regiões próximas à interface (Merwe, 2001) (Figura 1.7.). O cálculo deste decaimento é descrito em Materiais e métodos.

A técnica de *SPR* (*Surface Plasmon Resonance* ou Ressonância Plasmônica de Superfície), é utilizada para quantificar a variação no índice de refração causado pela presença de diferentes moléculas na superfície metálica e, também, monitorar em tempo real a associação de ligantes ao sensor. A partir desses dados é possível calcular espessuras de monocamadas de ligantes sobre a superfície, dados de constantes de cinéticas de associação e dissociação, além da quantidade de material adsorvido. Nesta tese, utilizamos para esses cálculos, o artigo de Suraniti et al. (2007) como referência, cujas fórmulas estão descritas em Materiais e métodos.

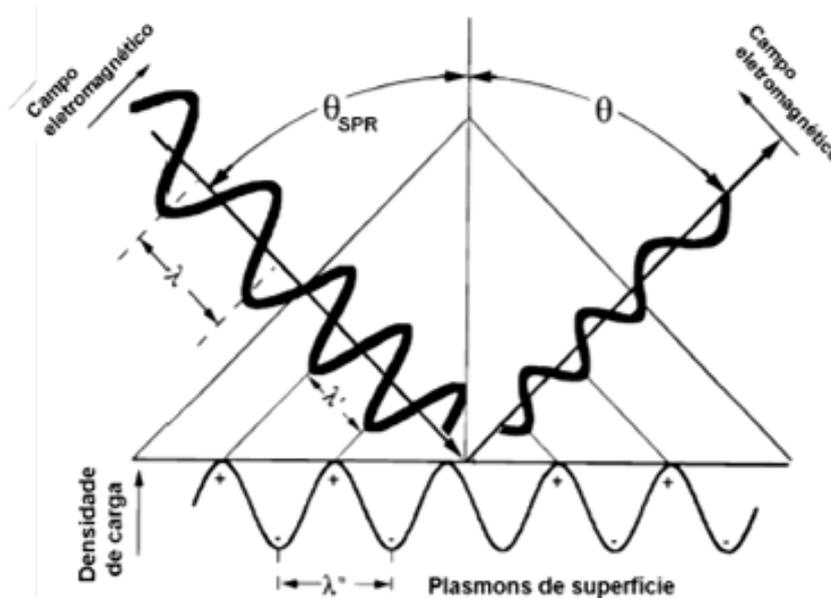


Figura 1.7 - Representação da geração de plasmons de superfície. A luz atravessa o prisma, excitando elétrons móveis na superfície do metal, gerando plasmons de superfície (figura adaptada de PETERLINZ e GEORGIADIS, 1996).

1.6.1.2 - Filmes finos de fosfolípidos – monocamadas e bicamadas

As monocamadas e bicamadas lipídicas podem ser formadas por diferentes técnicas, entre elas a de Langmuir-Blodgett e a adsorção em suporte sólido a partir de vesículas.

O trabalho pioneiro de TAMM & McCONNELL (1985) tornou a técnica de deposição de membranas biológicas muito popular para estudos de processos de membrana e aplicações biotecnológicas. Bicamadas lipídicas suportadas por substrato sólido (Figura 1.9) são mais robustas e estáveis que Bicamadas Lipídicas Planas (Figura 1.8), permitindo técnicas analíticas. Em sistemas sólidos suportados, a fluidez da membrana é mantida por uma camada de 10-20Å de água capturada entre o substrato e a bicamada (JOHNSON et al., 1991).

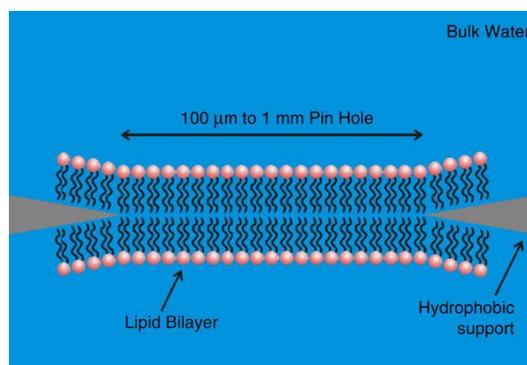


Figura 1.8 Esquema de Bicamada Lipídica Plana (Figura retirada de Castellana & Cremer, 2006).

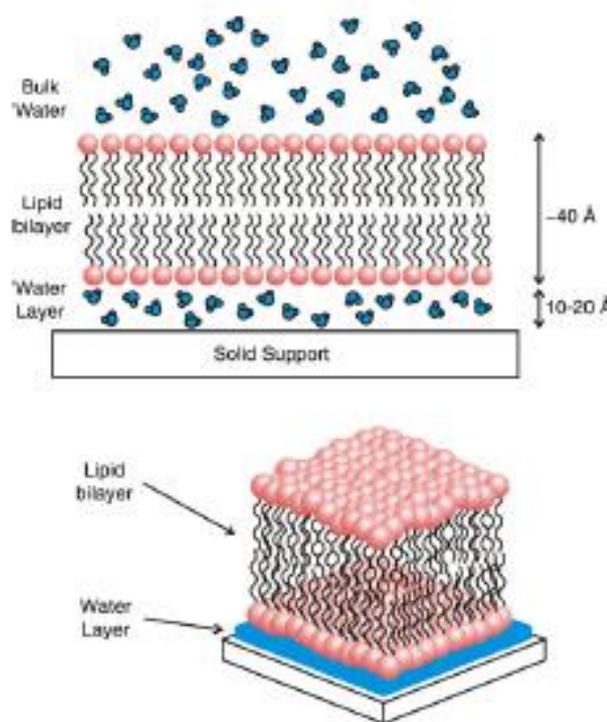


Figura 1.9 - Diagrama esquemático de uma bicamada em suporte sólido. A membrana é separada do substrato por uma fina camada (~10 a 20Å) de água. (Figura retirada de Castellana & Cremer, 2006)

O uso de Self-Assembly Monolayers (SAMs) na superfície de ouro foi primeiramente desenvolvido por Nuzzo e Allara, em 1983, com metil alcanotióis fornecendo uma bem definida superfície hidrofóbica para facilitar a formação da bicamada de membrana híbrida (Hybrid Bilayer Membrane - HBM) (PLANT et al., 1995). Octanodecanotiol é muito usado na formação da bicamada híbrida, pois forma monocamada altamente ordenada e empacotada. Vesículas de membrana em solução aquosa fundem-se espontaneamente à superfície hidrofóbica da monocamada de alcanotiol (PLANT, 1993) (Figuras 1.10 e 1.11). Este processo de fusão de vesículas de membranas biológicas à superfície pode ser monitorado por SPRi (HUBBARD & SILIN, 1998). Este procedimento deve representar um eficiente meio de apresentar superfícies biomiméticas contendo misturas naturais de

proteínas, lipídeos e receptores, assim como, membranas celulares de células geneticamente modificadas. Ainda não é claro como proteínas transmembranas interagem com essas superfícies, possivelmente imobilizando ou desnaturando-as, quando em contato com o substrato, no entanto diversos artigos têm obtido informações biológicas importantes da relação entre receptores e ligantes utilizando esta técnica (SURANITI et al. 2007). Sistemas suportados por polímeros têm sido desenvolvidos para contornar essa dificuldade (WONG et al., 1999) (Figura 1.12). Nesse caso, a adição de uma camada de polímero desacopla a membrana da superfície do sensor e permite o encaixe da proteína transmembrana sobre a superfície do sensor. Vários polímeros têm sido explorados para suportar bicamadas de lipídeos, como dextran, celulose, quitosana e poli eletrólitos.

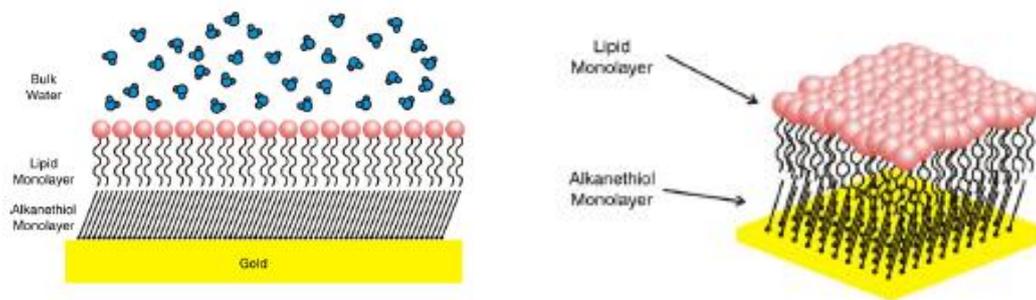


Figura 1.10 - Ilustração esquemática de uma bicamada híbrida. Uma camada simples de fosfolipídios de membrana se acomoda sobre a camada de alcantíol. (Figura retirada de Castellana & Cremmer, 2006)

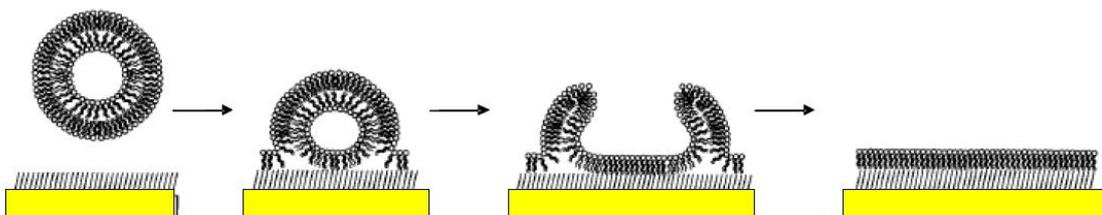


Figura 1.11 - Esquema do possível mecanismo para formação de monocamada lipídica sobre prisma funcionalizado com alcantíol. Inicialmente deve ocorrer a aproximação das vesículas na superfície, ruptura da camada externa e da estrutura vesicular como um todo e reorganização dos fosfolipídios da monocamada (ilustração adaptada de LINGLER et al., 1997)

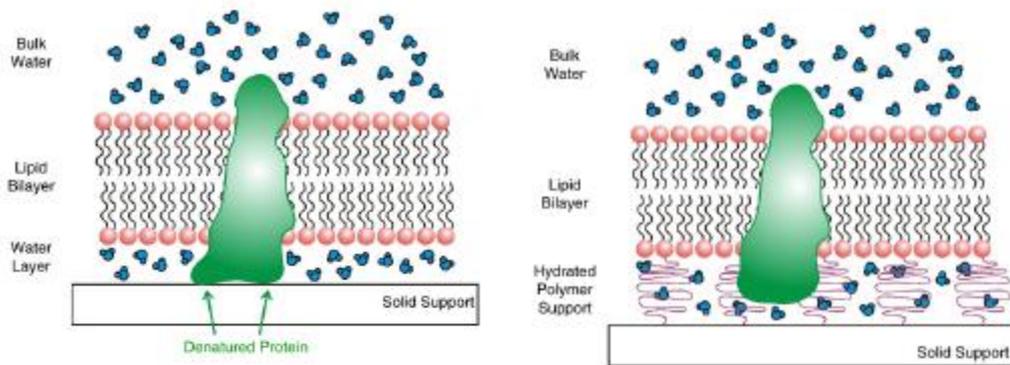


Figura 1.12 – Diagrama esquemático da bicamada suportada por polímero Domínios periféricos de proteínas transmembranares podem ser immobilizadas e desnaturadas em contato com o metal. Uma camada de polímero protege a proteína do contato ao metal. (Figura retirada de Castellana & Cremmer, 2006)

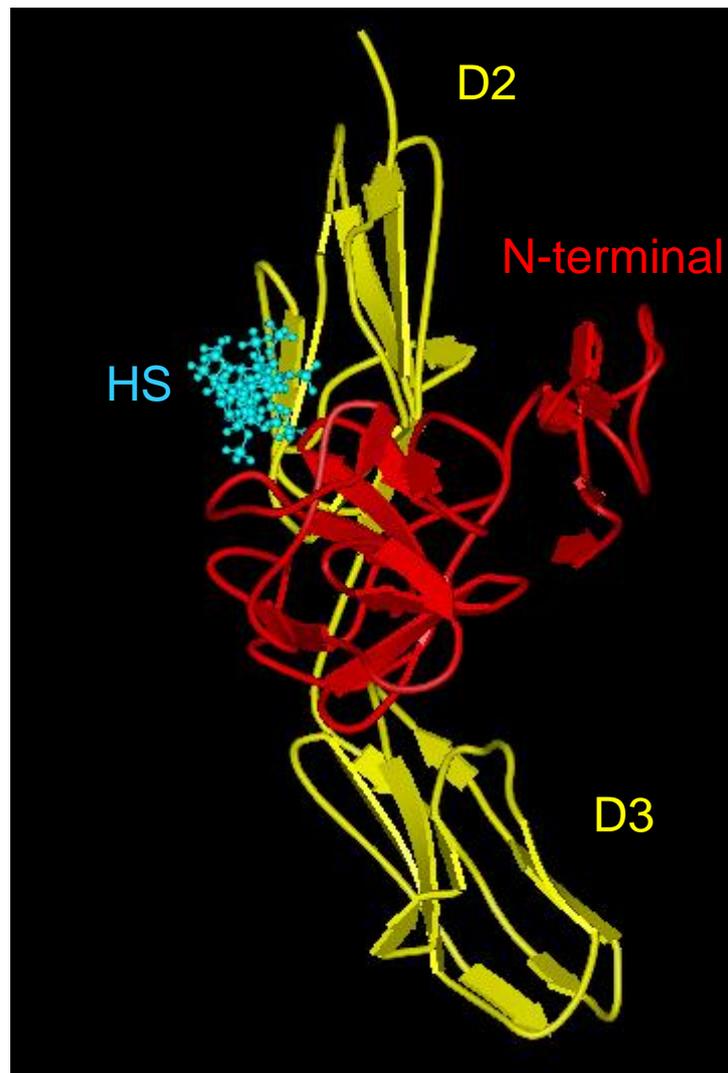
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho foi inicialmente planejado como um projeto de estudo da relação estrutura e função de FGF2. Conforme foi sintetizado na Introdução desta tese, o FGF2 apresenta uma singularidade entre os membros da família FGF: possui múltiplas isoformas que têm em comum o lado C-terminal de 155 resíduos de aminoácidos e massas moleculares crescentes devido a progressivas extensões da cadeia peptídica pelo extremo N-terminal. O menor, isto é, o FGF2-18kDa é secretado por vias não canônicas ainda desconhecidas e exerce funções parácrinas e autócrinas através da interação e ativação dos FGFRs transmembranares. Os demais FGF2s, de massas moleculares maiores, são intracelulares e devem exercer funções intrácrinas ainda não esclarecidas, apesar da vasta literatura sobre o tema e a reconhecida importância biológicas do FGF2.

Há cerca de 7 anos, Alexandre Dermargos Oliveira (então doutorando iniciante em nosso laboratório) juntamente com Sérgio Oyama Jr (na época pós-doutorando no laboratório de Alberto Spisni, no LNLS) se puseram a analisar comparativamente as estruturas 3D do FGF2-18kDa e do FGF2-22.5kDa por modelagem computacional. Desta análise concluíram, através de dinâmica molecular, que a alça extra de 55 resíduos de aminoácidos presente no lado N-terminal do FGF2-22,5kDa não interferia na estrutura do barril β , cuja estrutura 3D era idêntica para ambos os FGF2s analisados (Figura 2.1). Desta observação concluíram que o FGF2-22,5kDa deveria interagir bem e ativar os FGFRs e, portanto, exercer funções parácrinas e/ou autócrinas se liberado no meio extracelular (estes resultados ainda não foram publicados, mas foram totalmente descritos na tese de doutorado de Alexandre Dermargos). O teste experimental

desta inferência de Alexandre Dermargos e Sérgio Oyama sobre o potencial de interação e ativação dos FGFRs pelos FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa passou a ser o foco deste projeto de doutorado que tinha a intenção inicial de estudar a relação estrutura e função de FGF2.



Dermargos, A. (dados não publicados)

Figura 2.1 - Modelagem da interação do FGF2-22,5kDa aos domínios de ligação do FGFR. A estrutura do FGF2-22,5kDa (em vermelho) foi feita através de modelagem computacional, onde a sobreposição dos carbonos α do FGF2-22,5kDa aos do FGF2-18kDa ligado ao FGFR, mostrou que a alça de 55aa na porção amino terminal do FGF2-22,5kDa não interfere na ligação aos domínios de ligação do FGF ao receptor (amarelo) e ao segmento de Heparan Sulfato Proteoglicano (azul claro), permitindo sua ligação ao FGFR.

O desenho experimental primeiro planejado consistia em produzir diversas formas recombinantes de ambos FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa que seriam testados para atividade parácrina em ensaios biológicos com linhagens celulares definidas. O plano desta proposta era mais interessante do que pode parecer à primeira vista. Acontece que nosso laboratório tinha demonstrado que o FGF2-18kDa exerce uma atividade dual em células murinas malignas dependentes do oncogene K-ras da linhagem Y1, isto é, ativa FGFRs disparando vias mitogênicas clássicas, mas, também, ao mesmo tempo disparando uma via anti-proliferativa ainda desconhecida que causa bloqueio do ciclo celular e senescência (COSTA et al, 2004 e 2008). Mas, esta atividade dual é muito específica de FGF2-18kDa, pois seu parente estrutural mais próximo, o FGF1 exibe pouca atividade anti-proliferativa e o FGF5 mostra apenas atividade mitogênica com as células Y1, embora todos estes FGFs interajam bem com os FGFRs (COSTA et al, 2004 e 2008). Portanto, as semelhanças estruturais entre estes FGFs permitem que se liguem com alta afinidade aos FGFRs, mas diferenças estruturais ainda não identificadas levam a atividades biológicas diferentes.

Com isso tudo este projeto ganhou um foco bem definido: testar experimentalmente se o FGF2-18kDa e o FGF2-22,5kDa interagem igualmente com os FGFRs (hipótese proposta por Alexandre Derrmargos e Sérgio Oyama) e se esta interação causa efeitos biológicos idênticos. Para tanto, foram escolhidas para testes biológicos duas linhagens celulares de camundongo: a das células malignas Y1 e a dos fibroblastos Balb3T3, que são imortalizados mas não tumorigênicos. Além disso, uma série de objetivos específicos, descritos abaixo, foi planejada.

2.2. Objetivos específicos.

1) Produzir espécies recombinantes de ambos FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa, na forma de proteínas de fusão, com uma cauda de His pelo lado N-terminal e o domínio ligante de IgG da proteína A.

2) Analisar as atividades biológicas parácrinas de todas as espécies recombinantes conseguidas no objetivo anterior, com a linhagem celular de camundongo escolhida como modelo experimental: linhagem Y1 de células malignas adrenocorticais dependentes do oncogene K-ras.

3) Analisar a interação física entre as formas recombinantes de ambos FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa com vesículas microssomais das células Y1 através da técnica de ressonância plasmônica de superfície (Surface Plasmon Resonance – SPR)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1 Linhagens celulares

A linhagem celular Y-1 é derivada de tumor adrenocortical funcional de camundongo (YASUMURA et al. 1966; SCHIMMER, 1979), cresce em monocamada, foi adquirida da ATCC (American Type Culture Collection – Rockville, MD) em 1973 e é mantida em estoques congelados em nitrogênio líquido. Ela possui o proto-oncogene c-Ki-ras amplificado, tendo como consequência direta a elevação da forma ativa da proteína Ki-Ras GTP (SCHWAB et al., 1983; KIMURA & ARMELIN, 1988).

3.1.2. Bactérias

E.coli das linhagens DH5 α , DH10B, BL21 DE3 RIL, Arctic Express (Stratagene) são mantidas congeladas em estoques glicerinados e cultivadas rotineiramente segundo procedimentos padronizados (MANIATS, 1989).

3.1.3 - Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados para o desenvolvimento do projeto estão na tabela abaixo.

Plasmídeos	Origem
pcDNA 3.1 FGF2-ProA pcDNA 3.1. FGF2-22,5kDa-ProA	Construídos no laboratório do prof. Nilson Zanchin (LNLS), num projeto de colaboração com nosso grupo com participação do Dr. Alexandre Dermargos
pProEx Hta	Obtido comercialmente (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).
pEntr D-TOPO	
pDest17	

3.1.4- Meios de cultura

Para o crescimento e manutenção das linhagens Y1 e Balb 3T3 foi utilizado o meios de cultura DMEM (Dullbeco's Modified Eagle Médium) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), acrescidos de estreptomicina (100mg/L), ampicilina (25mg/L) e soro fetal bovino (Cultilab).

Já para a linhagem BaF3 e seus clones, utilizou-se o meio de cultura RPMI (Sigma Aldrich), complementado de L-glutamina (0,3g/L), NaHCO₃ (2,0g/L), sulfato de estreptomicina (100mg/L) e ampicilina (25mg/L), soro fetal bovino (10%, Cultilab) e IL-3 (0,5ng/mL, Peprotech). Nas linhagens derivadas de BaF3 e que expressam os receptores também era adicionado geneticina (400µg/mL, Invitrogen).

Para bactérias foram utilizados os meios de cultura: LB – Luria-Bertani Medium (10g/L Triptona, 5g/L Extrato de levedura, 10g/L NaCl, pH7.4); e 2YT (16g/L Triptona, 10g/L Extrato de levedura, 5g/L NaCl, pH7.0).

3.1.5- Coluna de cromatografia e resinas

HiTrap Heparin HP coluna de afinidade tendo como matriz heparina ligada a agarose; His trap coluna de afinidade que contém o íon Ni²⁺ ligado a agarose como matriz, ambas da GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). Ni NTA Agarose, resina onde íon Ni²⁺ é ligado covalentemente a matriz de agarose (Qiagen, Hilden, Alemanha).

3.1.6- Anticorpos comerciais

Anticorpos comerciais utilizados: anticorpo policlonal de coelho anti-c-Fos; anticorpo monoclonal de camundongo anti-H-Ras (ambos Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, EUA); anticorpo anti-Erk1/2 e anti-phospho-Erk1/2 (Thr202 e Tyr204) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA); anticorpo conjugado com peroxidase anti- IgG de coelho e camundongo (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

3.1.7 - Kits

GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare)

Kit ECL Western blotting Enhanced Chemoluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) – Western Blot;

Lipofectin (Invitrogen) – transfecção de células de mamíferos.

Perfect Prep Plasmid (Eppendorf) – para preparação de plasmídeos

3.1.8 - Enzimas

Enzimas de restrição: *EcoRI, XhoI, XbaI, StuI, BamHI, NcoI e HincII* (New England Biolabs, Beverly, EUA)

Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA);

DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA);

RNAse H; (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA);

T4 DNA Ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

3.1.9 - Soluções

Tampão de amostra para RNA – 10% formaldeído, 50% formamida, 10% glicerol, 2mM EDTA, 0,025% azul de bromofenol, 0,025% xileno cianol, 1x MOPS

Tampão de amostra para proteínas - 200mM tris-HCl, 400mM Ditioneitol, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol;

Tampão TBE - 450mM Tris-Borato, 10mM EDTA, pH8.0;

Tampão de corrida para SDS-PAGE – 25mM Tris Base, 250mM glicina, 0,1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), pH8,3

Tampão de lise - 62,5 mM Tris-HCl (pH6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT, 0,1% azul de bromofenol.

Tampão de transferência para SDS-PAGE: 25 mM Tris-base, 0,2 M glicina, 20% metanol (pH8,5);

Reagente de Bradford - Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate

Líquido de cintilação – 4g PPO, 0,1g POPOP em 1L de tolueno;

3.1.10- Reagentes

Ácido trifluoroacético (TCA), Albumina (BSA) (Sigma, St. Louis, EUA);

Metanol, Etanol, HCl e Formaldeído em solução (Merck, Rio de Janeiro, Brasil); SDS (“sodium dodecyl sulfate”, dodecil sulfato de sódio) e IPTG (isopropil-tio- β -galactosídeo”) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos (IDT, Coralville, IA,

EUA):

Nome do oligo	Seqüência (5' → 3')
FGF2(22,5kDa Forward)	CTAGTCCAGTGTGGTG GAATTCAT
FGF2 (Reverse com stop códon) (1)	TCC CTCGAGGTTAG CTCTTAGC
FGF2 (Reverse com stop códon) (2)	CGC TCTAGATTA GCTCTTAGCAGACATTGGAAG
Proteína A (reverse)	CCCTCTAGATCACGCGTCTACT

3.1.11 - Equipamentos:

Aparelho de cromatografia de proteínas de fase líquida (FPLC)
(LCC500 Plus - Amersham);

Espectrômetro de Cintilação Líquida (1600TR-Packard);

Ultracentrífuga (Sorvall);

Centrífugas refrigeradas (Hitachi e Sorvall),

Espectrofotômetro UV-vísivel ultropec 3100 (GE Healthcare,
Buckinghamshire, Reino Unido),

Termocicladores para PCR (Polimerase Chain Reaction) modelo
epgradientS (Eppendorf, Hamburg, Alemanha);

Fontes e cubas de eletroforese vertical e horizontal (Biometra,
Goettingen, Alemanha);

Estufas de CO₂ para cultura de células (Forma Scientific, Waltham,
MA, EUA)

SPRi LAB⁺ (Genoptics)

3.2 - Métodos

3.2.1. Cultura de células

Estoques das linhagens celulares foram mantidos congelados em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, as células foram mantidas em cultura em garrafas ou placas de poliestireno em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino. Essas culturas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5 % CO₂.

A troca do meio foi feita a cada três dias e no caso de subcultivo, o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBSA (NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ anidro 8mM e KH₂PO₄ 1,5mM – solução com pH 7,2) e tripsinizadas (solução 0,1% em PBSA e 1 mM de EDTA). Quando as células se soltam, foram ressuspensas em DMEM com soro e distribuída em várias placas ou garrafas.

3.2.2- Carenciamento celular

(Para arrestar o ciclo celular e sincronizar a população de células na interface G₀/G₁, as culturas foram carenciadas para FCS, através do seguinte protocolo: as monocamadas foram lavadas duas vezes com PBSA e uma vez com DMEM sem FCS e, em seguida, incubadas por 48h em DMEM. .

3.2.3- Transformação de bactérias

Uma suspensão de bactérias competente foi incubada juntamente com um plasmídeo de interesse no gelo, por 30 minutos. Em seguida, a suspensão foi colocada a 42°C por 60 segundos e recolocada no gelo por 3 minutos. Adicionou-se 1 mL de LB a essa suspensão e incubou-se a 37°C por 1h. As bactérias foram plaqueadas em LB sólido contendo o antibiótico adequado (ampicilina, kanamicina ou neomicina) e as colônias transformadas foram coletadas e expandidas em meio LB líquido

3.2.4 - Preparação de DNA plasmidial

Após a transformação das bactérias com o plasmídeo de interesse, retira-se uma colônia e fez-se uma “mini-prep” utilizando-se o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Os plasmídeos foram quantificados por gel de agarose (1%) e espectrofotometricamente (260 e 280 nm). Também foram seqüenciados e analisados por digestão enzimática.

3.2.5- Amplificação de fragmentos por Polimerase Chain Reaction (PCR)

A 10-50ng de DNA (plasmidial ou cDNA) foram adicionados dNTPs, MgCl₂, oligos específicos, a enzima Taq DNA Polimerase (0,5 U) e o seu respectivo tampão para a reação de PCR. Toda esta mistura é colocada no termociclador e as amplificações ocorreram em 25-40 ciclos, com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 1,5 minutos; anelamento a 50-60°C por 1,5 minutos; e

polimerização a 72°C por 2 minutos. O resultado foi analisado em uma eletroforese de gel de agarose.

3.2.6- Digestão e clonagem dos plasmídeos

Os produtos obtidos do PCR (DNA contendo os genes das proteínas de fusão) foram digeridos com diversas endonucleases de restrição: *BamHI*, *NcoI*, *XbaI*, *NheI*, *HindIII*, *NotI* e *EcoRI* (New England Biolabs - Beverly, EUA). Essas digestões foram feitas por 2 à 12h a 37° C, e a reação inativada por calor (65° C, 15 min). Para confirmação das digestões, as reações foram submetidas a gel de agarose (1% em TBE) e os produtos obtidos foram purificados do gel através do kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare).

Os fragmentos obtidos e digeridos foram submetidos à reação de ligação (1U de ligase; 20°C; 48 horas) nos plasmídeos pcDNA3.1 e pProEX-Hta digeridos com *EcoRI*/*XbaI*. O produto da ligação foi submetido a gel de agarose, purificado em coluna e a presença dos fragmentos de cDNA clonados foram confirmados por varreduras por PCR e por sequenciamento.

3.2.7- Sequenciamento

Todos os sequenciamentos foram realizados utilizando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que se baseia no método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Os ddNTPs são marcados com quatro tipos diferentes de rodaminas, um para cada ddNTP. A fluoresceína absorve energia incidente do laser do equipamento e transfere para a rodamina, que

por sua vez emite luz em seu comprimento de onda característico. Esta transferência de energia aumenta a sensibilidade do método

Os espectros obtidos foram analisados, utilizando o programa Chromas (Technelysium) e confirmadas por análise de homologia pela ferramenta Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Posteriormente, as seqüências obtidas foram alinhadas com as seqüências de origem através do software Clustwal (<http://www.ebi.ac.uk/clustawl>), com o intuito de verificar a integridade da seqüência, sem deleção ou inserção de nucleotídeos durante a reação de PCR.

3.2.8- Expressão de proteínas em *E.coli*

3.2.8.1- Expressão em baixa escala

Bactérias *E.Coli* da linhagem BL21 DE3, foram transformadas com plasmídeo pProEx-Hta, contendo o fragmento codificante das proteínas de interesse. Destas colônias foram feitos um pré-inóculo de 1mL de LB com antibiótico de seleção do plasmídeo, crescidos inicialmente por 12h a 37°C. Após este período foi adicionado mais 9 mL de meio e monitorado o crescimento até a absorbância do meio alcançar uma OD(600 nm) de 0,6-0,7. Neste momento foi feita a indução das proteínas recombinantes com 0,4mM de IPTG com tempos variando de 1 a 3 horas. Terminado o tempo de estímulo, os inóculos foram centrifugados (12000 rpm, 1 min, 4°C) e o “pellet” ressuspendido em 200 µL de tampão fosfato acrescido dos inibidores de protease (PMSF, Leupeptina, Aprotinina, Ortovanadato de Sódio e Pepstatina A) e submetidos a um SDS-PAGE e a coloração com Coomassie Blue.

O gel é analisado e visto qual o melhor tempo de indução de proteínas, ou seja, qual tempo apresenta mais proteína induzida. Caso a quantidade

de proteína induzida for muito baixa ou estiver em corpos de inclusão, pode-se alterar o protocolo aumentando o tempo de indução, concentração de IPTG, mudar a temperatura de indução, etc.

3.2.8.2- Expressão em alta escala

Bactérias *E.Coli* da linhagem BL21 DE3, foram transformadas com plasmídeo pProEx-Hta, contendo o fragmento codificante das proteínas de interesse. Destas colônias é feito um pré-inóculo de 10mL de LB com antibiótico (12h a 37°C), Após este período foi adicionado mais 1 L de meio e segue-se o monitoramento e indução descritos anteriormente. Terminada a indução, a cultura é centrifugada (5000 rpm, 5 min., 4°C), o “pellet” foi ressuscitado em tampão de lise (50 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0 e 0,5% Nonidet-P40) acrescidos de inibidores de protease (PMSF, Leupeptina, Aprotinina, Ortovanadato de Sódio e Pepstatina A) e a mistura foi lisada por sonicação (10 pulsos de 15 segundos, com intervalos de 1 min entre um pulso e outro, no gelo).

O extrato bruto de bactérias foi clarificado através der centrifugação (15000 rpm, 30 min., 4°C), o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro Millipore de 0,22µm e em seguida congelado a -20°C ou imediatamente levado à purificação.

3.2.9 - Purificação de proteínas

As proteínas produzidas foram purificadas por dois métodos: através de esferas (“beads”) de Ni-NTA e através de cromatografia de afinidade; e depois analisadas por SDS-PAGE.

3.2.9.1 - Purificação por beads de Ni NTA

A 10 mL do extrato celular de bactérias foram adicionados 500 μ L de beads de Ni²⁺ (Qiagen,) e mantidos sob agitação por 60 minutos. Os beads foram lavados 3 vezes com PBS gelado, seguidos por duas lavagens de 2 mL de tampão fosfato pH7,4 (20mM de fosfato de sódio, 500mM de NaCl e 20mM de Imidazol). As proteínas foram eluídas num gradiente de imidazol (100, 200, 250, 350 e 500mM de Imidazol) acrescido dos inibidores de proteases (PMSF, Leupeptina, Aprotinina, Ortovanadato de Sódio e Pepstatina A).

3.2.9.2 - Purificação de proteínas por cromatografia de fase líquida (FPLC)

O extrato protéico foi filtrado e injetado em um FPLC (5-10mg de proteína total) montado com uma coluna de afinidade a heparina (Hi Trap Heparin HP – GE Healthcare) ou de histidina (His-Trap; GE Healthcare). Toda proteína com afinidade à coluna será retida e eluída através de um gradiente de NaCl (variando de 0M a 2,5M) no caso da coluna de heparina, ou um gradiente de imidazol (variando de 20mM a 500mM) no caso da coluna de Ni²⁺. Durante o gradiente, todas as frações eluídas foram coletadas através de um coletor.

No uso da coluna His-Trap, tomou-se o cuidado de não se adicionar agentes quelantes, tais como DTT, EDTA ou EGTA, devido ao “sequestro” de Ni²⁺ ligados à matriz de agarose da coluna.

3.2.10- Análise de expressão de proteínas:

As frações de proteínas eluídas no FPLC foram analisadas em géis SDS-PAGE (PoliAcrilamide Gel Eletroforese). Os géis são corados com Coomassie Brilliant Blue, nitrato de prata ou submetidas à análise de Western Blot.

3.2.10.1. SDS-PAGE

Cerca de 100 µg de proteína foram desnaturadas (100°C, 5 minutos) em tampão de amostra para proteínas (Tris-HCl 200mM, β-mercaptoetanol 20%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,4% e glicerol 40%, pH 6,8) e aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante (10-15% acrilamida/bis-acrilamida, contendo SDS 0,1%) para a realização da eletroforese (40-50V, 12 horas).

3.2.10.2 - Coloração de gel de poliacrilamida com Coomassie-Blue

Incubou-se o gel em uma solução de Coomassie Brilliant Blue (0,1% Coomassie Blue G-250, 25% metanol, 5% ácido acético) por 30 minutos. Após esse período, o excesso do corante é lavado com uma solução descorante (30% etanol e 10% ácido acético) até o aparecimento das bandas.

3.2.10.3.. Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata

O gel é fixado com uma solução de 10% de ac. acético + 30% de etanol por 60 minutos; depois é incubado em uma solução contendo 2 mL de glutaraldeído, 6,8 g acetato de sódio e 0,2 g tiosulfato de sódio em 100 mL de H₂O, por 1h ou “overnight”. Após essa etapa, o gel é lavado em água destilada por no mínimo 3x por 10 minutos, depois incubado em 0,1 g de nitrato de prata + 28,6 µL de formaldeído, por 20-60 minutos; e revelado com uma solução (4,8 g de Carbonato de sódio e 57,2 µL de formaldeído em 100 mL de H₂O) até o surgimento de bandas (ocorre a precipitação da prata). Ao surgimento de bandas, a reação é bloqueada com 1,86 g de EDTA em 100 mL de ddH₂O.

3.2.10.4- Análise de proteínas por Western Blot:

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C-Extra, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), através de uma cuba “semi-dry” (Bio Rad). Terminada a transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S (0,1% Ponceau, 10% de ácido acético glacial), para verificar a eficiência da transferência. Lavou-se a membrana com TBS-T (10mM Tris base pH8,0, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) 3 ciclos de 10 min. e em seguida bloqueou-se a membrana quanto à ligação inespecífica do anticorpo com 5 % de leite desnatado ou 5% de BSA em TBS-T por 2 horas, a temperatura ambiente. Foi feita a incubação com o anticorpo primário (“overnight”, a 4°C e diluído de 1:200 a 1:1000 em TBS-T). No dia seguinte, a membrana foi lavada (TBS-T, 3 vezes, 10 minutos), depois incubada com o anticorpo secundário acoplado à enzima peroxidase durante 1 hora. Após esta hora, a membrana foi lavada novamente com

TBS-T, e fez-se a detecção com o kit ECL Western blotting Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.11 - Extração de proteínas celulares

As células foram plaqueadas, carenciadas em soro por 48 horas e estimuladas conforme descrito. Após o fim do estímulo as células foram lavadas com PBS (KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM, CaCl₂ H₂O 0,7 mM e MgCl₂ 6H₂O 0,5 mM, pH 7,2) gelado e rompidas com tampão RIPA (NP-40 1%, NaCl 150 mM, Tris-Cl 50 mM, SDS 0,1% e deoxicolato de sódio 0,5%, pH 7,5), adicionado de inibidores de protease e de fosfatase (ortovanadato de sódio 1,0 mM, PMSF 1,0 mM, aprotinina 2 µg/mL, pepstatina A 2 µg/mL). Após incubação em gelo por 10 minutos, as células foram raspadas com o auxílio de um policial ("cell scraper"), centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min e realizada a coleta do sobrenadante. A dosagem de proteína total foi feita utilizando-se o reagente de Bradford (BioRad) (BRADFORD, 1976).

3.2.12 - Ensaio clonogênico

Células são plaqueadas de 500 a 2000 células/P60 (60 mm - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) em meio DMEM e seus tratamentos (indicado em cada experimento). Passadas 24 horas nessas condições, as células foram lavadas 1x com PBS e 1x com DMEM e voltam a crescer em meio completo (DMEM + 10% FCS). A cada 2-3 dias o meio é renovado até o momento da fixação das colônias, o FGF2 é mantido no meio de cultura. A cada 2-3 dias o meio é renovado até o momento da fixação das colônias. Após 10-15 dias formam-se colônias visíveis e suas células foram fixadas em formaldeído 3,7% por 15 min e coradas em cristal violeta (10 min).

3.2.13- Ensaio de Imunocitoquímica

2000 células são plaqueadas em lamínulas de vidro em placas p60 (60 mm - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) em meio DMEM e seus tratamentos (indicado em cada experimento). Passadas 5 minutos nessas condições, as células foram lavadas 1x com PBS e fixadas com formaldeído 3,7% por 15 minutos. As células são incubadas por 15 minutos com PBS + 0,05% de triton X-100 para permeabilizar a membrana para a entrada do anticorpo primário anti-ERK1/2 fosforilado. Após a permeabilização, as lamínulas são bloqueadas com PBS +0,5% de soro fetal bovino por 1 hora. Terminado esse tempo, as lamínulas são lavadas 3 vezes com PBSA, sob agitação e posteriormente incubadas com PBSA + 3% de soro fetal + o anticorpo primário, por 12-17h, a 4°C. Após essa incubação, as lamínulas são lavadas 3xPBSA por 10 minutos, sob agitação, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário biotinilado por 1 hora. Após esse período, as

lamínulas são lavadas 3xPBSA sob agitação e incubar com estreptoavidina peroxidase por 1 hora, lavar 3x com PBSA, incubar com cromogênio DAB por 5 minutos, lavar em água corrente. Contrastar com hematoxilina por 3 minutos e diferenciar em H₂O amoniacal.

3.2.14- Preparação das membranas biológicas por centrifugação diferencial

Células (~10⁷ células) foram crescidas conforme descrito anteriormente e a coleta das células foi realizada por centrifugação. Ao “pellet” foi adicionado tampão hipotônico e a lise realizada em homogenizador “*douncer*” (15 vezes). Este lisado foi centrifugado (15 min, 13.000rpm, 4°C) para decantar núcleos, mitocôndrias e debris celulares.

Este lisado pós mitocondrial foi centrifugado (100.000g, 60 min, 4°C) e o “pellet”, que é uma fração membranar, foi ressuspendido em 1mL de PBSA gelado e homogeneizado em vesículas menores pela passagem através de um filtro de 0,20 µm (20x) a 30°C.

3.2.14 - Funcionalização do prisma

Os prismas foram lavados em solução “piranha” (Ácido.Sulfúrico 75% e peróxido de hidrogênio 25%) por 20 minutos e depois lavados com água bidestilada e em seguida em etanol absoluto. Depois os prismas são incubados com uma solução 2,5mM de Octanodecano tiol em etanol (“overnight”). O octanodecano tiol vai se ligar ao prisma e funcionar com um ligante das vesículas de membrana.

Após funcionalização com o octadecano tiol, o prisma é lavado com etanol absoluto e depois com água bidestilada e submetida à cinética de ligação.

3.2.15 - Cinética de ligação

A vantagem de utilizar o SPRi é permitir a visualização do sensor nas diversas etapas de ligação (Figura 3.1), através de imagem direta (a) e imagem diferencial (b-c) que mostra qualitativamente a ligação do material injetado (quanto mais material, mais clara a visualização).

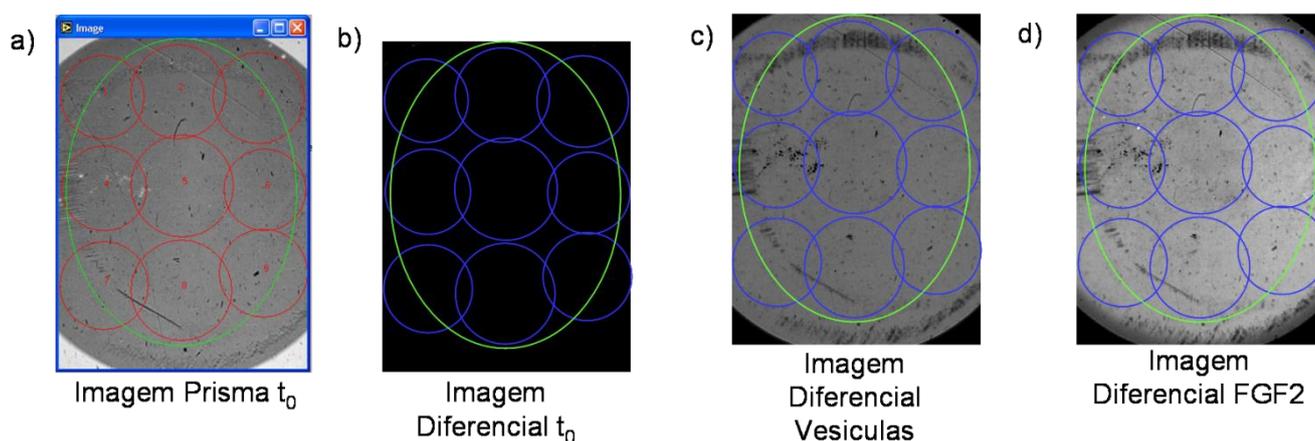


Figura 3.1 - Imagens geradas pelo SPRi durante a formação do HBM e cinética de associação do FGF2 ao biosensor. a) Imagem dos spots selecionados; b) Imagem diferencial em água bidestilada; c) Imagem diferencial após adsorção das vesículas de membranas de células Y1; d) Imagem diferencial após associação de FGF2 ao HBM.

Os prismas depois de funcionalizados foram submetidos ao seguinte protocolo (Figura 3.2). Inicialmente é adicionada água destilada ao sistema de SPRi, para verificar se o octanodecano tiol não está se desligando do prisma. Em seguida é feita a seleção das áreas (“spots”) a serem analisados (Figura 3.1a e b). Após a escolha das áreas, lavamos com o tampão degaseificado (PBSA; Figura 3.1c) e

injetamos as vesículas de membrana contendo todos os receptores, deixamos descansar no sistema por duas horas, para a formação da bicamada híbrida de membrana (do inglês *Hybrid Bilayer Membrane – HBM*). Em seguida é injetado PBSA no sistema para retirar o excesso de vesículas (caso permaneçam ligadas ao prisma a reflectibilidade não cai); adicionamos BSA para cobrir possíveis espaços no ouro que não tenham sido cobertas com o octanodecano tiol (esses espaços vazios no prisma pode provocar um viés no resultado). E por últimos injetamos o ligante (Figura 3.2), lavamos com PBSA para retirar o excesso de ligante e realizamos as medidas (Figura 3.3).

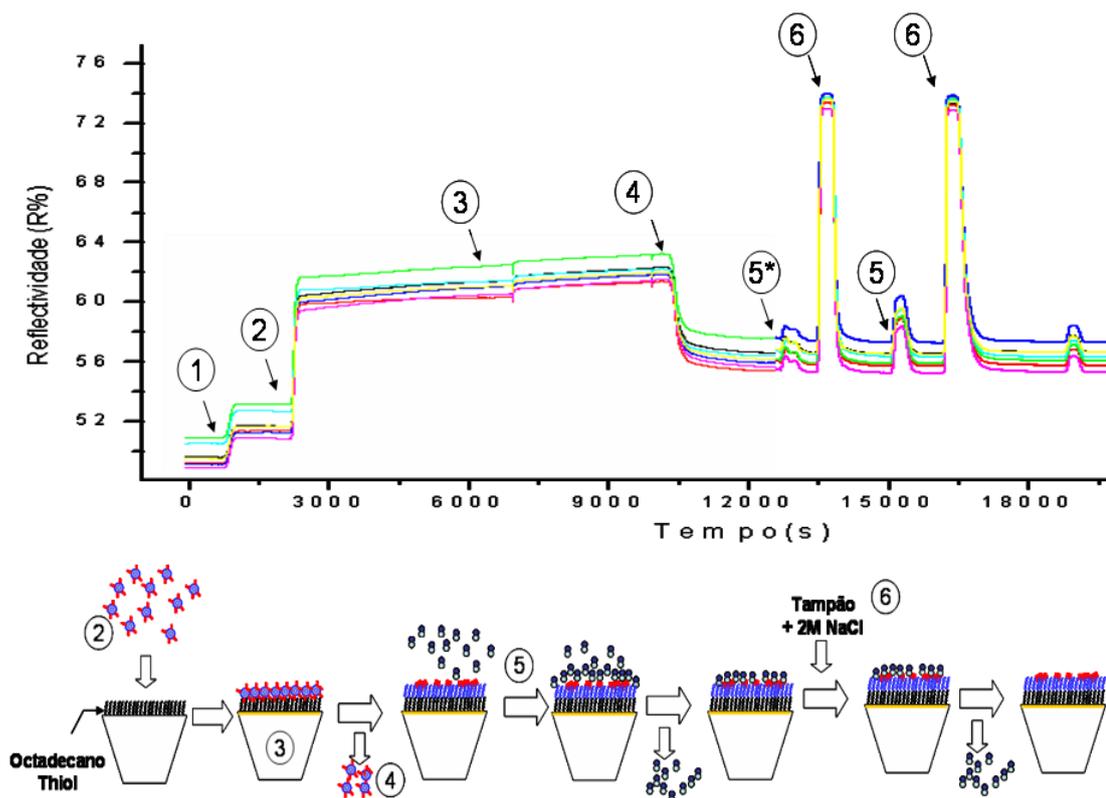


Figura 3.2 – Cinética de ligação do FGF2 ao biosensor. Acima, Leitura obtida durante cinética de ligação, onde o sensor funcionalizado com octanodecano tiol é lavado com água destilada e depois com tampão (1), após estabilização do sinal, é injetado as vesículas de membrana (2), onde ficam em repouso por 2h; após esse período, o biosensor é lavado com tampão (4). Para verificar a integridade do biosensor é injetado 1mg/ml de BSA (5*), para cobrir possíveis regiões sem membrana. O biosensor é lavado com tampão + 2M de NaCl, para verificar a estabilidade (6) e em seguida inicia-se a cinética de associação do FGF2 (5).

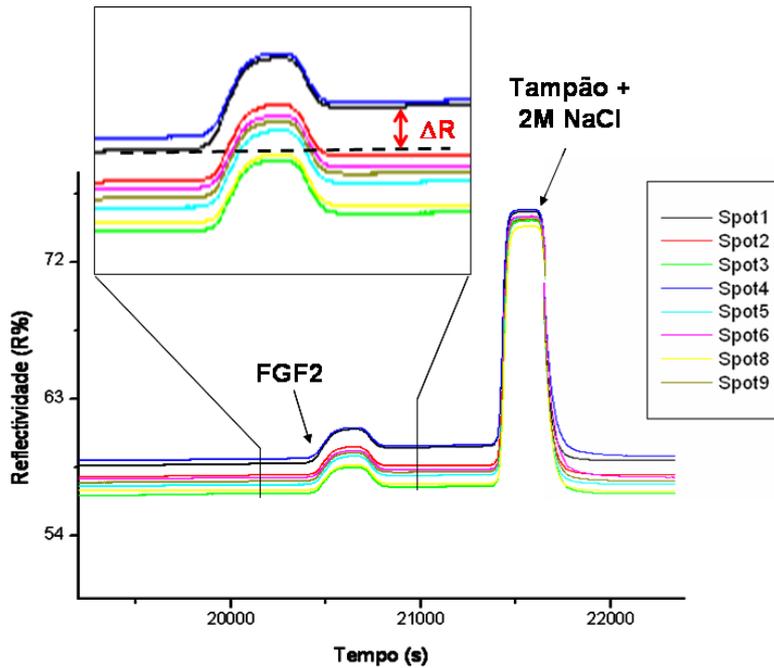


Figura 3.3 – Cinética de ligação do FGF2 ao biosensor. Para a recuperação do biosensor para associações sucessivas, injetamos no sistema solução de tampão fosfato com 2M de NaCl, para que o FGF2 ligado se desligue do biosensor.

3.2.16- SPR – Fórmulas utilizadas nos cálculos das espessuras e quantidades de material adsorvido no HBM, através da técnica de Ressonância de Plasma de Superfície

Para o cálculo da quantidade de material adsorvido (Γ) (em $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$, $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ ou $\text{moléculas}\cdot\text{cm}^{-2}$) é dada pela equação: $\Gamma = d^*[(n_a - n_b) / (dn/dC)]$, onde d é a espessura (em nm), n_a é o índice de refração do adsorbato, n_b é o índice de refração do tampão e dn/dC é a variação do índice de refração em função da concentração. São utilizados nestes cálculos os valores de $n_a=1,62$ (Ross et al., 2001), $n_b=1,332$ para tampão fosfato e $dn/dC=0,185\text{cm}^3/\text{g}$. Para o cálculo da espessura, utilizamos a seguinte equação:

$$d = -\left(\frac{l_d}{2}\right) \ln\left(1 - \frac{n_{eff} - n_b}{n_a - n_b}\right)$$

onde o l_d é o decaimento exponencial da onda evanescente relacionada à distância da superfície metálica, que é calculada pela equação

$$l_d = \left(\frac{\lambda}{2\pi}\right) / \left[\frac{-n_{eff}^4}{(n_{eff}^2 + \varepsilon_{metal})}\right]^{1/2}$$

onde, ε é a constante dielétrica do ouro (-23,124); n_{eff} é o valor de índice de refração monitorado pelo equipamento, ou seja, é o índice de refração do sistema (n_b) após a ligação do adsorbato vezes o fator de decaimento: $N_{eff} = n_b + (\Delta n)[1 - \exp(-2d/l_d)]$. O calculo da variação do índice de refração é dado através da relação $\Delta R/\Delta n = 2869,8$ onde ΔR variação da reflectividade (%R), obtido direto do aparelho SPRi. Este valor é retirado de uma curva de calibração de sacarose, em função da mudança do índice de refração.

A possibilidade das análises serem efetuadas em tempo real e sem necessidade de marcação faz com que a técnica de SPR seja utilizada principalmente na obtenção de constantes de associação e dissociação biomoleculares nas mais diversas áreas e em centenas de trabalhos, como no estudo de interação antígeno-anticorpo, interação de proteínas modificadas e entre ligantes e seus receptores específicos.

4. RESULTADOS

4.1. Produção de espécies recombinantes de FGF2-18kDa e FGF2-225kDa, na forma de proteínas de fusão: problemas de isolamento e caracterização.

4.1.1. Estratégia de clonagem das seqüências codificantes de FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa e suas fusões

Para a construção dos plasmídeos, digerimos o plasmídeo pProEx Hta (Invitrogen) com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Os fragmentos codificantes de FGF2-18kDa ProA, FGF2-22,5kDa ProA e FGF2-22,5kDa a serem subclonados, foram amplificados, a partir de vetores de expressão em células de mamíferos, usando oligonucleotídeos com os sítios de restrição para as enzimas citadas anteriormente (Figura 4.1 e Tabela 4.1). O plasmídeo e os fragmentos codificantes foram ligados e a ligação foi confirmada através de digestão e sequenciamento.

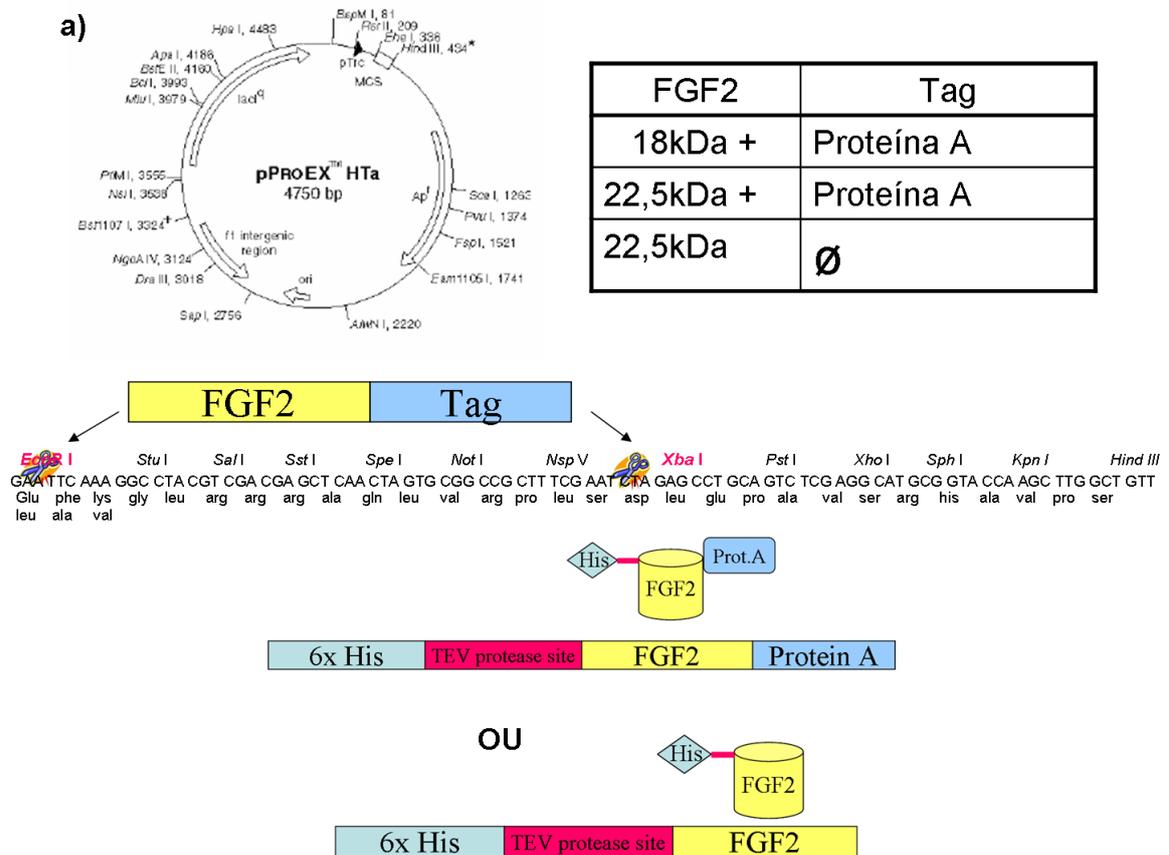


Figura 4.1 – Esquema geral da construção das proteínas recombinantes. As seqüências codificadoras das proteínas de interesse foram amplificadas por reação de PCR, digeridas com enzimas de restrição e subclonadas no vetor de expressão pProEx Hta digerido com as mesmas enzimas.

Tabela 4.1 – Tabela geral dos tamanhos dos fragmentos de cDNA (BP) e dos pesos moleculares das proteínas de fusão.

Proteína	Fragmento DNA (bp)	Peso molecular (kDa)
FGF2-18kDa	468	18
His-FGF2-22,5kDa	633	25,1
Proteína A	390	14,5
His-FGF2-18kDa-ProA	957	36,9
His-FGF2-22,5kDa-ProA	1122	41,3

Os plasmídeos obtidos foram transformados em *E.coli* para expressão das proteínas, conforme protocolo padrão descrito em materiais e métodos.

A proteína de fusão His-FGF2-18kDa ProA foi isolada após indução de 3h (Figura 4.2a) e sua eluição da coluna His trap se deu entre 115mM (fração 15) e 350mM de Imidazol (fração 21), conforme mostrado no gel corado com Coomassie (Figura 4.2b). Anticorpos Anti FGF2 e Anti- Penta His reconhecem a proteína de fusão (setas nas figuras 4.2c e 4.2d, respectivamente). As frações 17 a 20 foram ajuntadas (na concentração de 4,6 mg/mL), separadas em alíquotas de 50 μ L e congeladas para os ensaios posteriores.

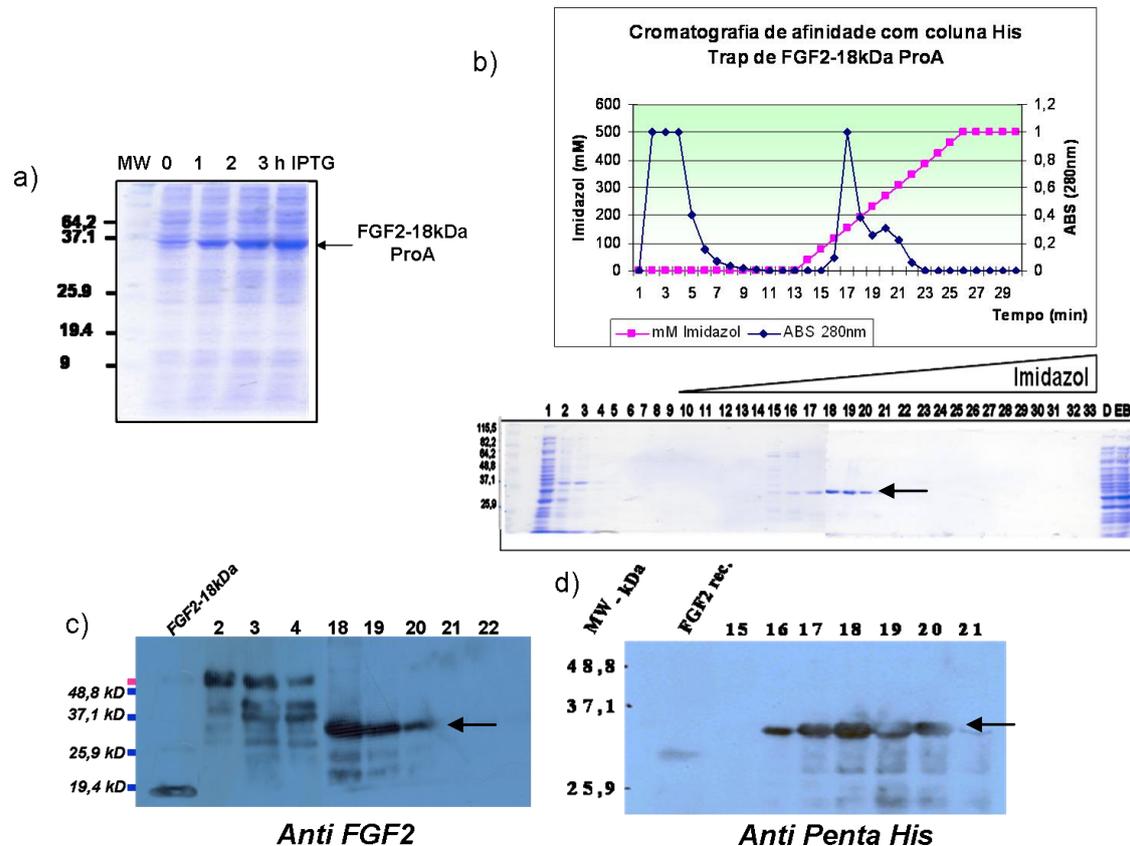


Figura 4.2. Purificação por cromatografia de afinidade de His-FGF2-18kDa ProA em coluna His Trap. a) Indução de síntese da proteína em *E.coli*, cepa DH10B, com 0,6mM de IPTG, com tempos variando de 1 a 3 horas. b) Cromatograma de eluição da proteína de fusão His-FGF2-18kD ProA (foram aplicados 60mg de proteína do lisado total de bactérias) através de uma coluna de Ni²⁺ agarose, com gradiente de Imidazol, variando de 0 a 0,5mM; As frações eluídas, em solução de 0,5M NaCl + Imidazol, foram submetidas à eletroforese em SDS PAGE, e coradas com Coomassie Blue. Observar um pico de eluição do His-FGF2-18kDa ProA, entre 250 a 375mM de imidazol. Western Blot realizado com anticorpo: c) Anti FGF2 das frações eluídas 2-4 e 18-22 e d) Anti Penta His, frações 15 a 21. Foram aplicados volumes iguais das frações.

A eluição da proteína de fusão His-FGF2-22,5kDa ProA da coluna His trap iniciou-se em 76mM (fração 13) e terminou em 350mM de Imidazol (fração 19), mostrado no gel corado com Nitrato de prata (Figura 4.3b) e em Western blot com anticorpo Anti FGF2 (Figura 4.3c). Anticorpos Anti FGF2 e Anti- Penta His reconhecem a proteína de fusão (Figuras 4.3d e 4.3e, respectivamente). As frações 13 a 17 foram ajuntadas, (na concentração de 1,2 mg/mL), separadas em alíquotas de 50µL e congeladas para os ensaios posteriores.

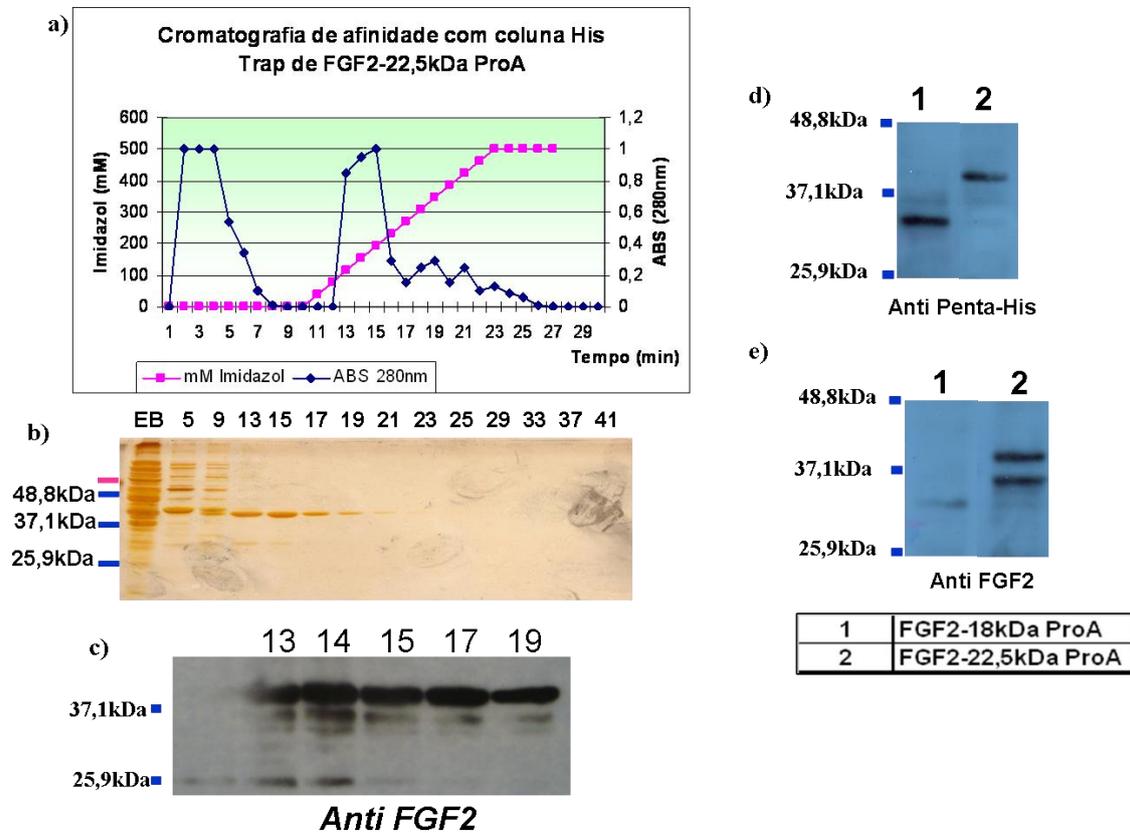


Figura 4.3 Purificação da proteína His-FGF2-22,5kD ProA de extratos celulares de *E.coli*. a) Cromatograma da separação de afinidade pela cauda de Histidina de His-FGF2-22,5kD ProA; b) Coloração de Prata de SDS-PAGE das frações selecionadas da cromatografia de afinidade (pontos vermelhos em a); c) Western blot das frações eluídas com anticorpo Anti-FGF2; d) e e) Western blot de (1) alíquotas de FGF2-18kDa ProA obtidas anteriormente e (2) FGF2-22,5kDa ProA com anticorpo Anti-Penta His e Anti-FGF2, respectivamente.

A proteína de fusão His-FGF2-22,5kDa também foi isolada após indução de 3h (Figura 4.4a) e foi eluída da coluna His trap entre 76mM (fração 15) e 230mM de Imidazol (fração 19), mostrado no gel corado com Nitrato de prata (Figura 4.4b e 4c - esquerda) e em Western blot com anticorpo Anti Penta His e Anti FGF2 (Figuras 4.4c centro e direita, respectivamente). Para os experimentos, as frações 17 e 18 foram ajuntadas, feitas alíquotas menores e congeladas.

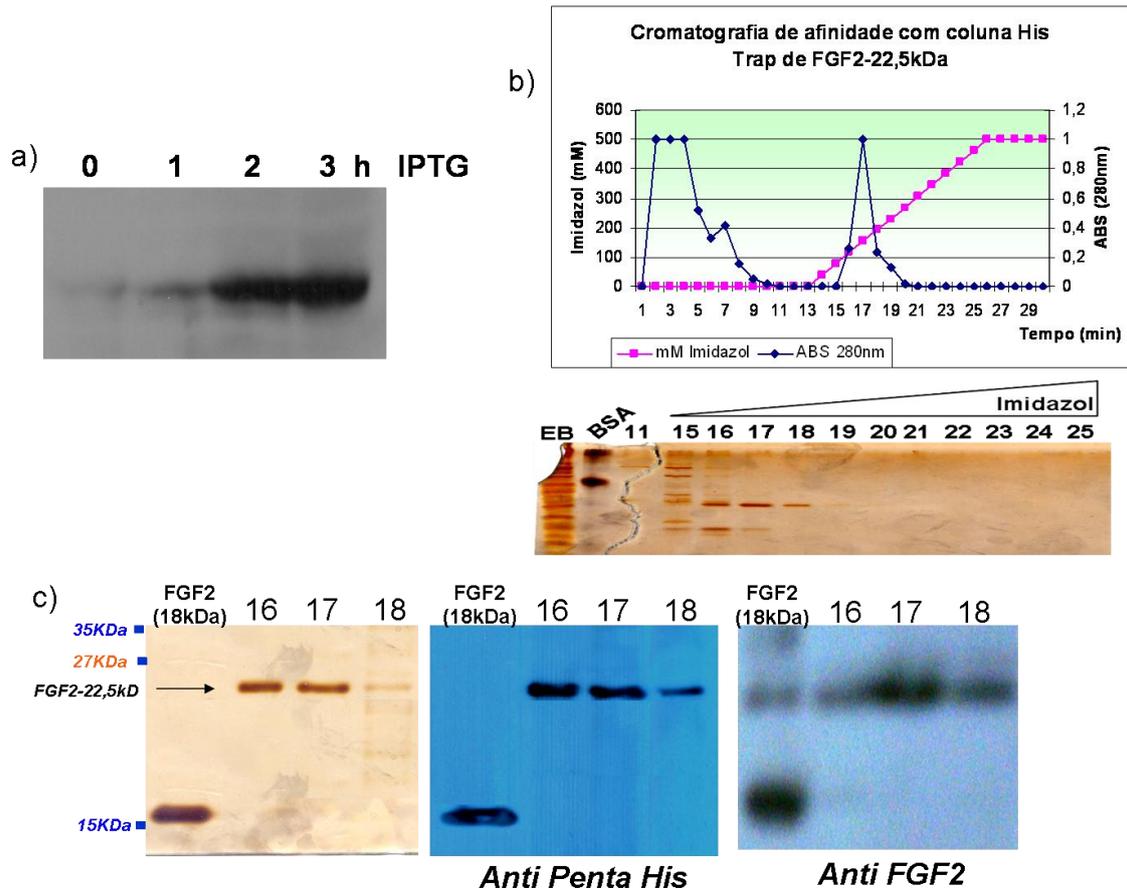


Figura 4.4. Produção e Purificação da proteína recombinante de His-FGF2 de 22,5kDa em *E.coli*, cepa DH10B em coluna His Trap a) Western blot com anticorpo Anti-FGF2, mostrando indução de síntese de proteínas por IPTG (1mM) por 0, 1, 2 e 3 horas de indução; b) Cromatograma da purificação por afinidade em coluna His Trap de His-FGF2-22,5kDa, mostrado no gel corado com nitrato de prata; c) Esquerda: Coloração da proteína FGF2-22,5kDa por Nitrato de prata das frações 16 a 18; Centro e Direita Western blot das frações 16 a 18, com anticorpo Anti Penta His e Anti FGF2, respectivamente.

Para comparar o rendimento das purificações das diferentes proteínas recombinantes, foram feitas quantificações das frações, pelo método de Bradford, foram somadas as quantidades totais da proteína recombinante purificada e feito à relação proteína total purificada/proteína total (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Tabela de rendimento das purificações das proteínas recombinantes em *E.coli*

His FGF2-18kDa ProA	Coluna His Trap	
	Quant. Prot. Injetada do Ext. Bruto (mg)	60
	Cap. Ligação da Coluna (mg/mL)	3
	Quant. Prot. Eluída (mg/mL)	4,67
	Rendimento	8%
His FGF2-22,5kDa ProA	Coluna His Trap	
	Quant. Prot. Injetada do Ext. Bruto (mg)	60
	Cap. Ligação da Coluna (mg/mL)	3
	Quant. Prot. Eluída (mg/mL)	2,3
	Rendimento	4%
His FGF2-22,5kDa	Coluna His Trap	
	Quant. Prot. Injetada do Ext. Bruto (mg)	60
	Cap. Ligação da Coluna (mg/mL)	3
	Quant. Prot. Eluída (mg/mL)	0,5
	Rendimento	1%
FGF2-18kDa	Coluna de Heparina	
	Quant. Prot. Injetada do Ext. Bruto (mg)	60
	Cap. Ligação da Coluna (mg/mL)	3
	Quant. Prot. Eluída (mg/mL)	9,602
	Rendimento	16%

Visando aumentar o rendimento, principalmente das proteínas His FGF2-22,5 kDa, uma cinética de indução foi feita, variando de temperaturas de 29 a 37°C e também variando a quantidade de IPTG, de 0,2 a 1mM (Figura 4.5). Nossos resultados mostram que ocorre o aparecimento de uma banda no peso esperado, nas amostras induzidas, mas a proteína está presente nos precipitados pós-lise (pellet), indicando que ocorreu a lise incompleta da bactéria ou que a proteína estava insolúvel em corpos de inclusão.

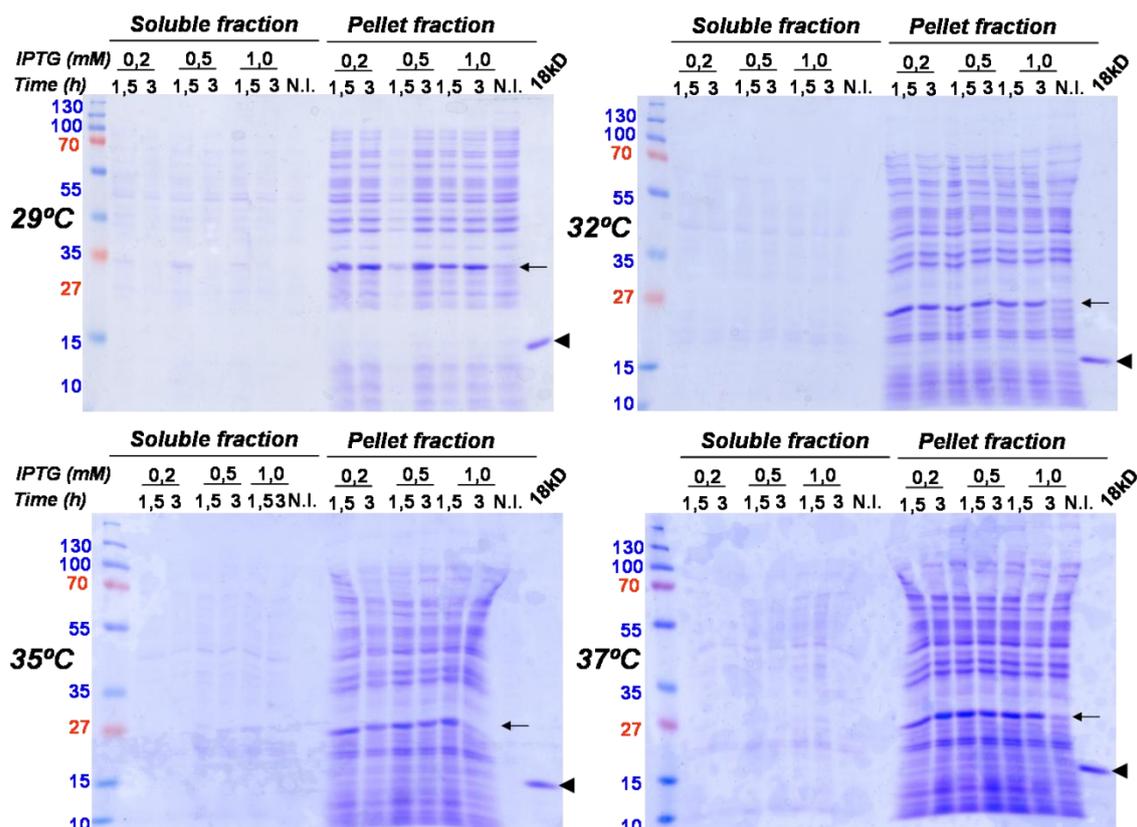


Figura 4.5. Indução de *E.coli* DH10B em diferentes temperaturas e concentrações *E.coli* DH10B foram transformadas com pProEx Hta FGF2-22,5kDa e submetidas à indução por 3h com 0,2; 0,5 e 1mM de IPTG nas temperaturas de 29, 32, 35 e 37°C (N.I – controle não induzido). As bactérias foram lisadas com 5 pulsos de 15s de sonicação, centrifugadas para separar a fração solúvel e o precipitado (Pellet), o pellet foi ressuscitado em tampão fosfato e as amostras foram desnaturadas a 100°C por 10 minutos e aplicadas em SDS PAGE e coradas com Azul de Coomassie. As colorações mostram que quase não se encontra His-FGF2-22,5kDa na fração solúvel, mas sim insolúvel no pellet.

Para melhor o rendimento da proteína solúvel, optei mudar o promotor, do promotor *trc*, existente no plasmídeo pProExHta (Invitrogen) para o T7 do vetor pDest 17, essa mudança aumentou a quantidade de proteína His-FGF2-22,5kDa em solução.

Outra alternativa utilizada para aumentar o rendimento da proteína His-FGF2-22,5kDa, foi a utilização da bactéria *E.coli* cepa Arctic, que possui duas chaperonas (HSP10 e HSP70), que facilitam o dobramento da proteína, podendo aumentar a sua solubilidade. Induzimos com 0,6mM de IPTG a 13°C por 24h, e

notamos um aumento na quantidade de proteína solúvel, mas associada às chaperonas, indicado pelas setas (Figura 4.6).

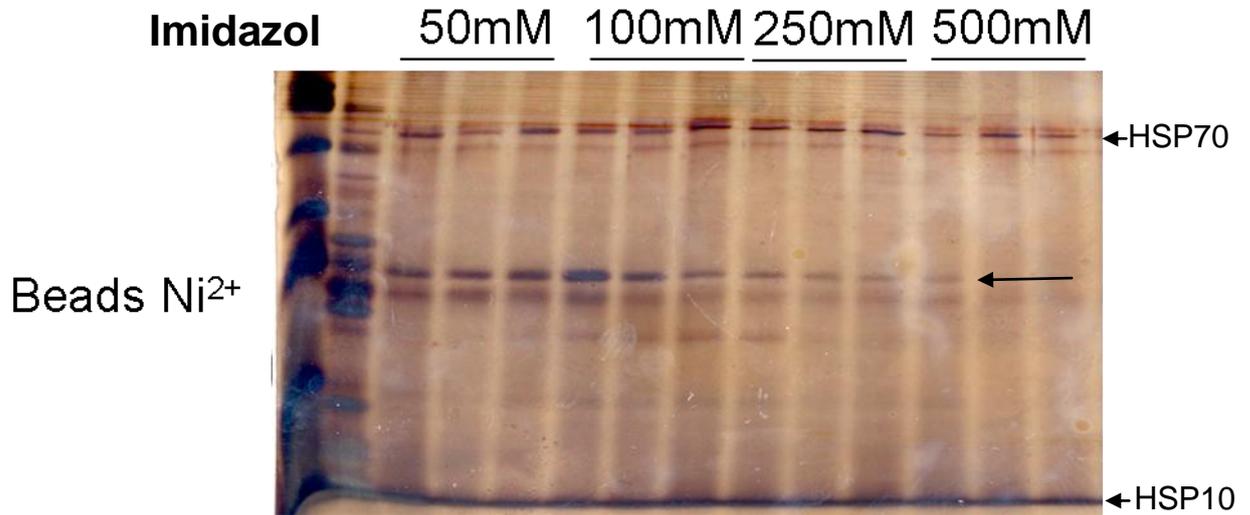


Figura 4.6. Indução de His-FGF2 de 22,5kDa em *E.coli*, Arctic em coluna His Trap *E.coli*, Arctic foram transformadas com pDest17 FGF2-22,5kDa e induzidas com 0,6mM de IPTG por 24h a 13°C. As bactérias foram lisadas e o extrato bruto adicionado 500uL de beads Ni²⁺ agarose. Os beads foram lavados com PBS e as proteínas eluídas com PBS+ 50, 100, 250 e 500mM de Imidazol. His-FGF2-22,5kDa foi eluído conforme mostrado no gel corado com nitrato de prata, mas junto com o His-FGF2-22,5kDa, aparecem as chaperonas HSP 10 e 70, indicados pelas setas.

Tabela 4.3 Tabela de rendimentos, estabilidade e pI das proteínas recombinantes purificadas a partir de extratos de *E.coli*

Proteína	Rendimento (mg/mL)	Estabilidade	pI
FGF2-18kDa	-	Alto	9,58
His-FGF2-18kDa-ProA	4,6	Alto	8,47
His-FGF2-22,5kDa-ProA	2,3	Baixo	9,57
His-FGF2-22,5kDa	0,5	Baixo	10,26

4.2. Atividade biológica das formas recombinantes de FGF2-18kDa e His-FGF2-22,5kDa

4.2.1 Os recombinantes His-FGF2-18kDa ProA e His-FGF2-22,5 ProA disparam vias antagônicas nas células malignas Y1 dependentes do oncogene k-ras; iniciando vias de sinalização mitogênica e bloqueando o ciclo celular na fase S. Mas o recombinante His-FGF2-22,5kDa dispara apenas vias mitogênicas.

4.2.1.1- Os recombinantes His-FGF2-18kDa ProA, His-FGF2-22,5kDa ProA e His FGF2-22,5kDa ativam ERK e induzem o gene c-fos

Para testar a atividade biológica da proteína de fusão, as células Y1 foram tratadas com His-FGF2-18kD ProA, na concentração de 5ng/mL, por tempos que variaram 5 a 75 minutos. Como controle negativo, usamos as células não tratadas (K5), e como controles positivos células tratadas por 5 minutos com 5ng de FGF2-18kDa (F5) e 10%FCS (S5). Os lisados foram submetidos à SDS-PAGE e posteriormente a Western Blot com anticorpo Anti ERK1/2 fosforilado e Anti ERK total (Figura 4.7a). Observamos que His-FGF2-18kDa ProA possui atividade biológica, pela ativação de ERK1/2 e c-Fos (Figura 4.7b), comparados aos controles, células carenciadas e estimuladas com FGF2 e 10%FCS. Células carenciadas não apresentam fosforilação de ERK, somente sob estímulo de mitógeno, como FGF2 ou FCS. Além disso, c-Fos é um fator de transcrição induzido através da de ERK fosforilada no núcleo celular.

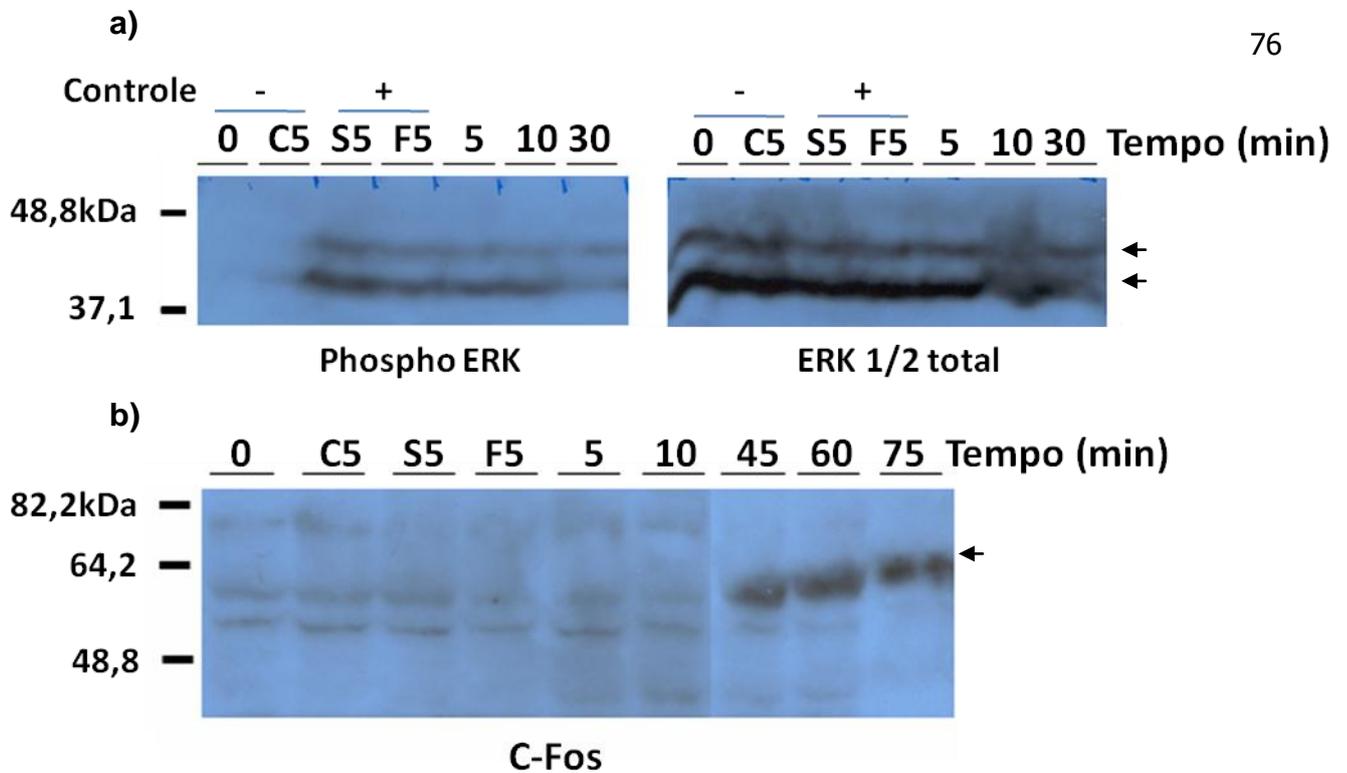


Figura 4.7. Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-18kDa-ProA
 As células são estimuladas com a fração 18 (5ng/mL) por tempos variando de 5 a 75 minutos. As carenciadas e os controles foram lisados em 5 minutos após o estímulo. a) controles positivos são 5ng/mL de FGF2 (F5) e 10% FCS (S5); como controle negativo, as células carenciadas (C5). Os lisados foram submetidos à SDS-PAGE e Western Blot; a membrana foi incubada por 17h com anticorpo **a)** Anti-ERK 1/2 e Anti-Phospho ERK e **b)** Anti-c-FOS e posteriormente incubadas com anticorpo secundário Anti-coelho;

Para testar a atividade biológica da proteína de fusão, pela ativação dos receptores de FGF, as células Y1 foram tratadas com His-FGF2-22,5kD ProA, na concentração de 5ng/mL, por tempos que variaram 30 a 90 minutos. Como controle negativo, usamos a célula carenciada de soro fetal bovino por 48h (0), controles positivos para indução de síntese de c-FOS, 5ng de His-FGF2-18kDa (FGF2-18kDa) e 10%FCS (FCS) por 30 a 90 minutos. Os lisados foram submetidos à SDS-PAGE e posteriormente a Western Blot com anticorpo Anti c-FOS (Figura 4.8). Observamos que His-FGF2-18kDa ProA possui atividade biológica, pela aumento de expressão de c-Fos, comparados aos controles, células carenciadas e estimuladas com FGF2 e 10%FCS.

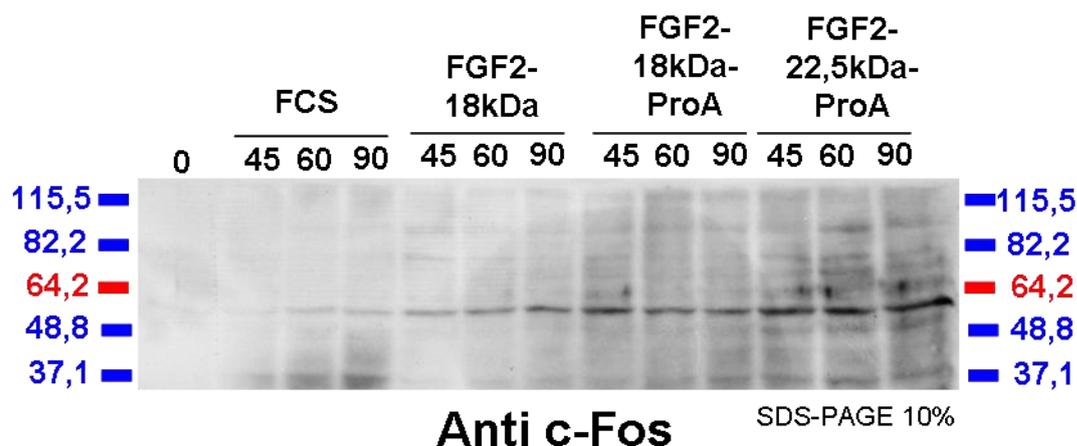


Figura 4.8 - Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-22,5kDa-ProA: As células são estimuladas com His-FGF2-22,5kDa ProA (5ng/mL) por tempos variando de 30 a 90 minutos. Western blot com anticorpo Anti c-FOS.

Para testar a atividade biológica de His-FGF2-22,5kDa, pela ativação dos receptores de FGF, células Y1 foram tratadas com His-FGF2-22,5kDa, na concentração de 5ng/mL, por 5 e 60 minutos. Como controle negativo, usamos a célula carenciada de soro fetal bovino por 48h (C), controles positivos i) para ativação de ERK1/2, 5ng de His-FGF2-18kDa e 10%FCS, todos sob estímulo de 5 minutos ii), 5ng de His-FGF2-18kDa e 10%FCS, sob estímulo de 60 minutos. Os lisados foram submetidos à SDS-PAGE e posteriormente a Western Blot com anticorpo Anti ERK1/2 fosforilado (Figura 4.9). Observamos que His-FGF2-22,5kDa possui atividade biológica, pela fosforilação de ERK1/2 e síntese de c-Fos (Figura 4.9), comparados aos controles, células carenciadas e estimuladas com FGF2 e 10%FCS.

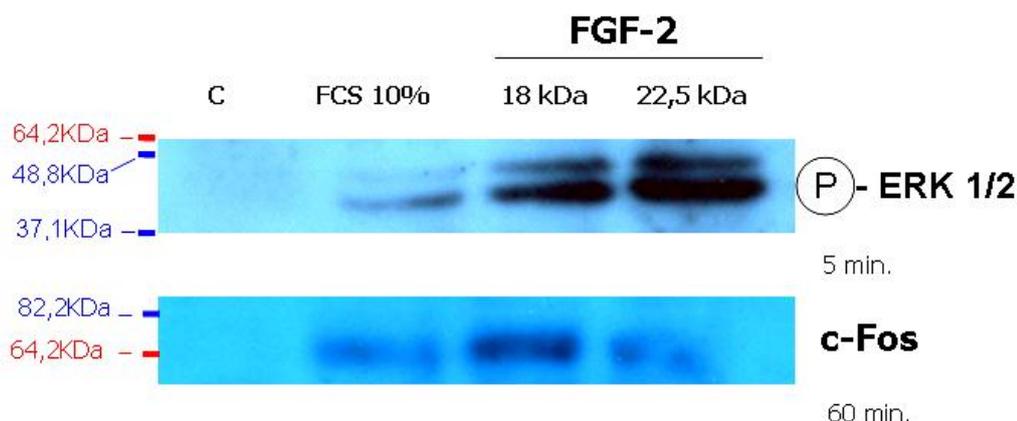


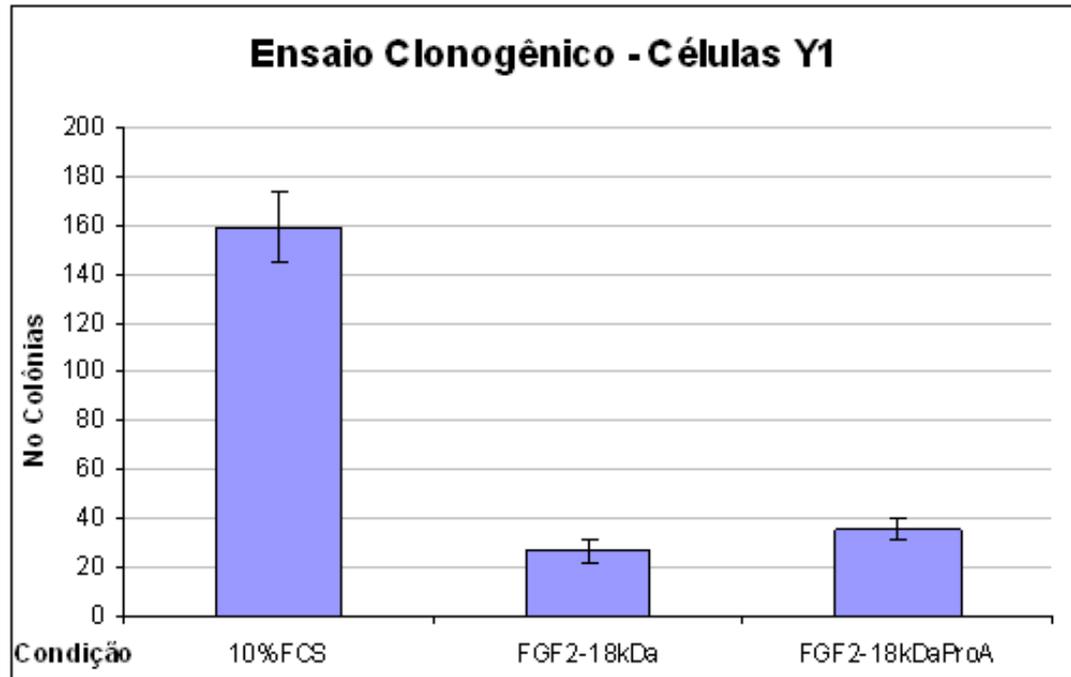
Figura 4.9: Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-22,5kDa: As células Y1 carenciadas (C) são estimuladas com 5ng/mL de His-FGF2-22,5kDa por 5 e 60 minutos. Os controles positivos são FGF2 (5ng/mL) e FCS (10%); como controle negativo, células carenciadas; os controles foram lisados em 5 minutos após o estímulo. Os lisados foram submetidos à SDS-PAGE e Western Blot com anticorpo Anti-Phospho ERK e com anticorpo Anti-c-FOS.

4.2.2- O His-FGF2-22,5kDa Proa, mas não o His-FGF2-22,5kDa, bloqueia a proliferação celular como FGF18kDa e His FGF2-18kDa ProA

4.2.2.1- Ensaio Clonogênico

A proteína His-FGF2-18-ProA mimetiza a atividade mitogênica do FGF2-18, conforme demonstrado pela ativação de ERK1/2 e indução da síntese de c-FOS (Fig. 4.7). Nosso laboratório relatou anteriormente que o FGF2-18 também dispara um efeito anti-mitótico em células malignas dependentes de Ras (COSTA et. al., 2008). Neste trabalho demonstramos que His-FGF2-18-ProA também dispara este efeito antimitótico reduzindo de 5X o número de colônias em ensaios clonogênicos (Fig. 4.10).

A



B

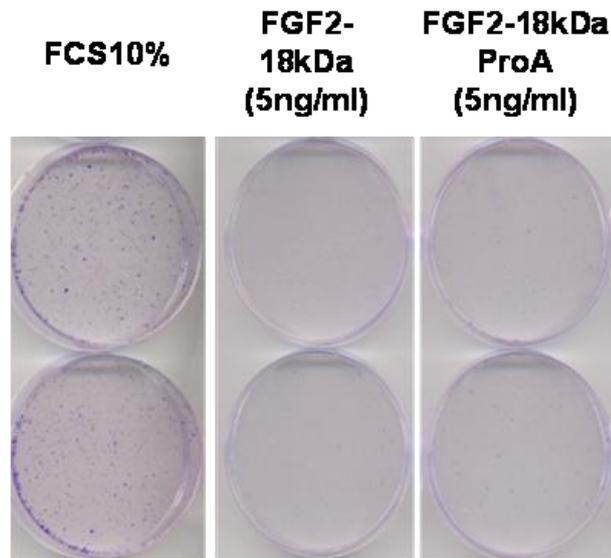


Figura 4.10: Atividade anti-mitótica de His-FGF2-18kDa ProA através de ensaio clonogênico - 2000 células Y1 foram plaqueadas em placas de 28,3cm² (p 60mm) em 10%FCS-DME e estimuladas ou não com FGF2 (5ng/ml) ou His-FGF2-ProA (5ng/ml) por 24h. Em seguida o meio de cultura de todas as placas foram trocados por 10%FCS-DME sem FGF e incubadas por 14 dias para crescimento de colônias visíveis. A) gráfico com as contagens e desvio do ensaio clonogênico; B) fotos do ensaio.

4.2.2.2- Análise de atividade biológica de His-FGF2-22,5kDa ProA, através do ensaio clonogênico

A proteína His-FGF2-22,5kDa ProA apresentou o mesmo efeito anti-proliferativo apresentado pelo FGF2-18kDa, com uma inibição em torno de 50% do controle (Figura 4.11).

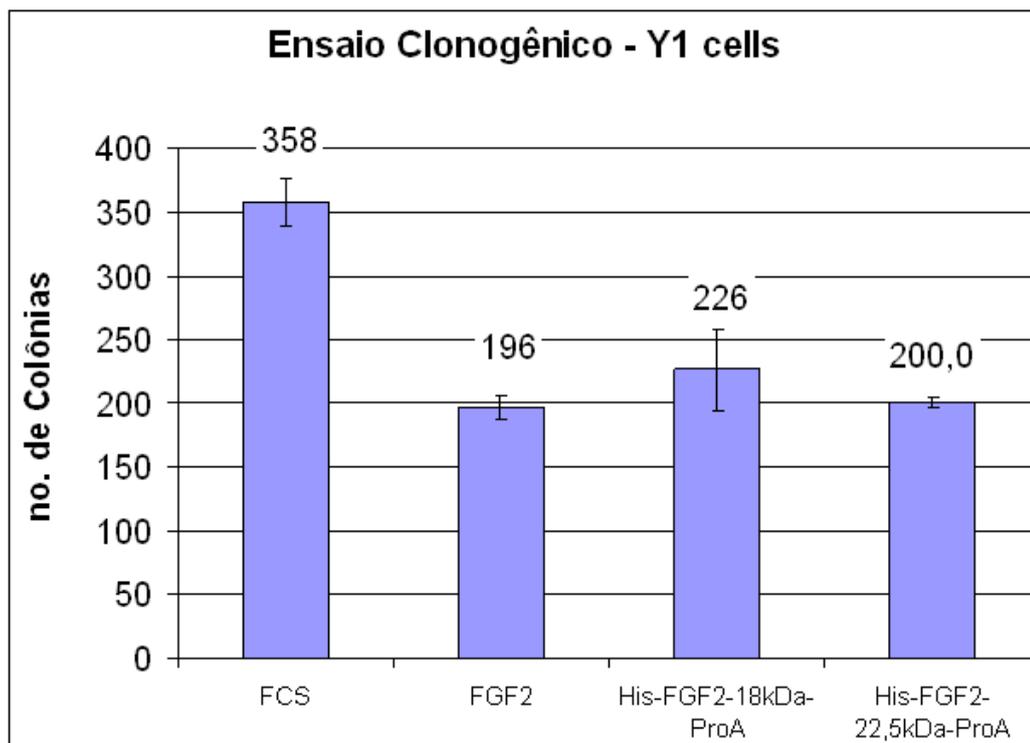


Figura 4.11: Teste de atividade biológica das frações eluídas de His-FGF2-22,5kDa ProA de 22,5kDa a) 10^3 células Y1 são plaqueadas em placas p60, submetidas a diferentes tratamentos (FGF2-18kDa, His-FGF2-22,5kDa ProA, FCS e DMEM) por 24h e mantidas em FCS por 14 dias. As quantificações foram plotadas em gráfico de barras para melhor visualização.

4.2.2.3- Curvas de crescimento mostram que FGF2-18KDA inibe proliferação em células Y1 e His-FGF2-22,5KDA protege as células deste efeito inibitório.

Curvas de crescimento mostram que FGF2-18kDa e FGF2-18kDa ProA bloqueiam a proliferação em células Y1, enquanto que His-FGF2-22,5kDa causa somente uma menor inibição (Figura 4.12a e 4.12b). sendo o mesmo efeito visto pela formação de colônias em substrato sólido, que implica no bloqueio da proliferação (Figura 4.13).

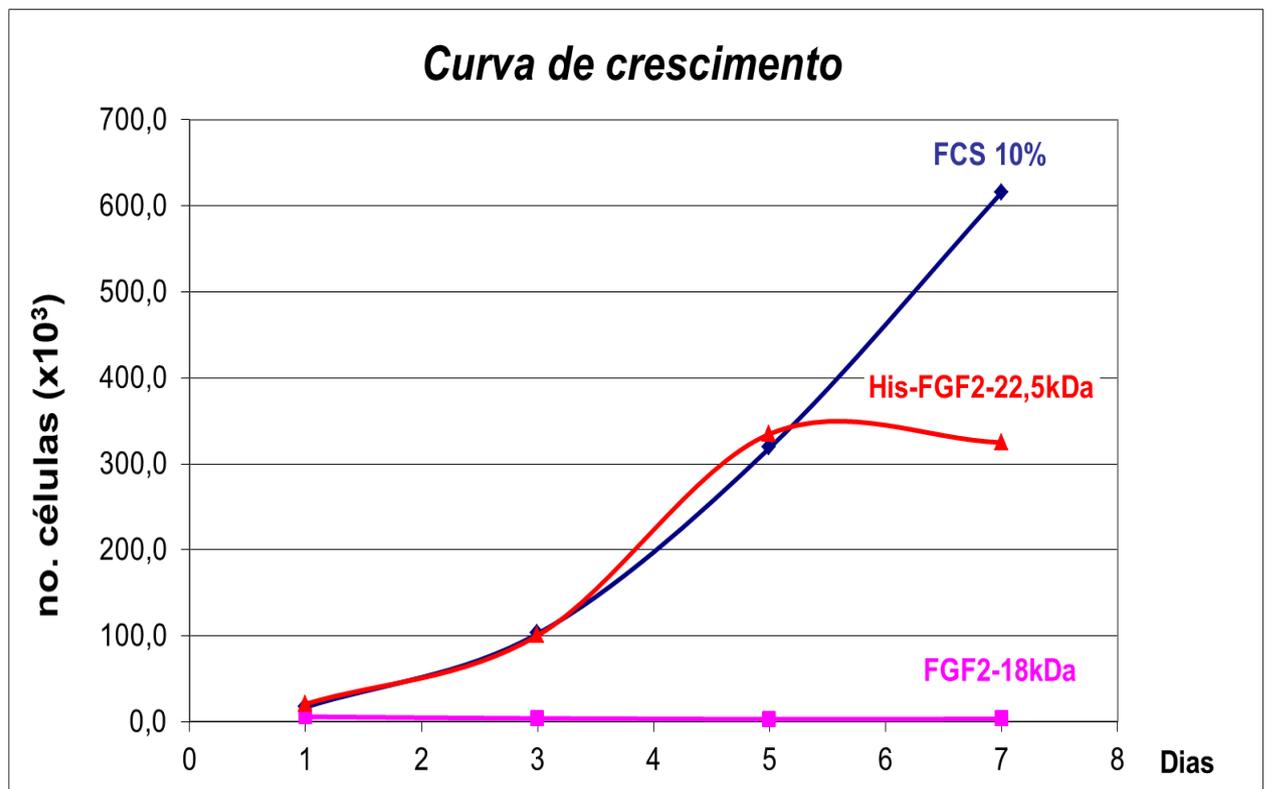
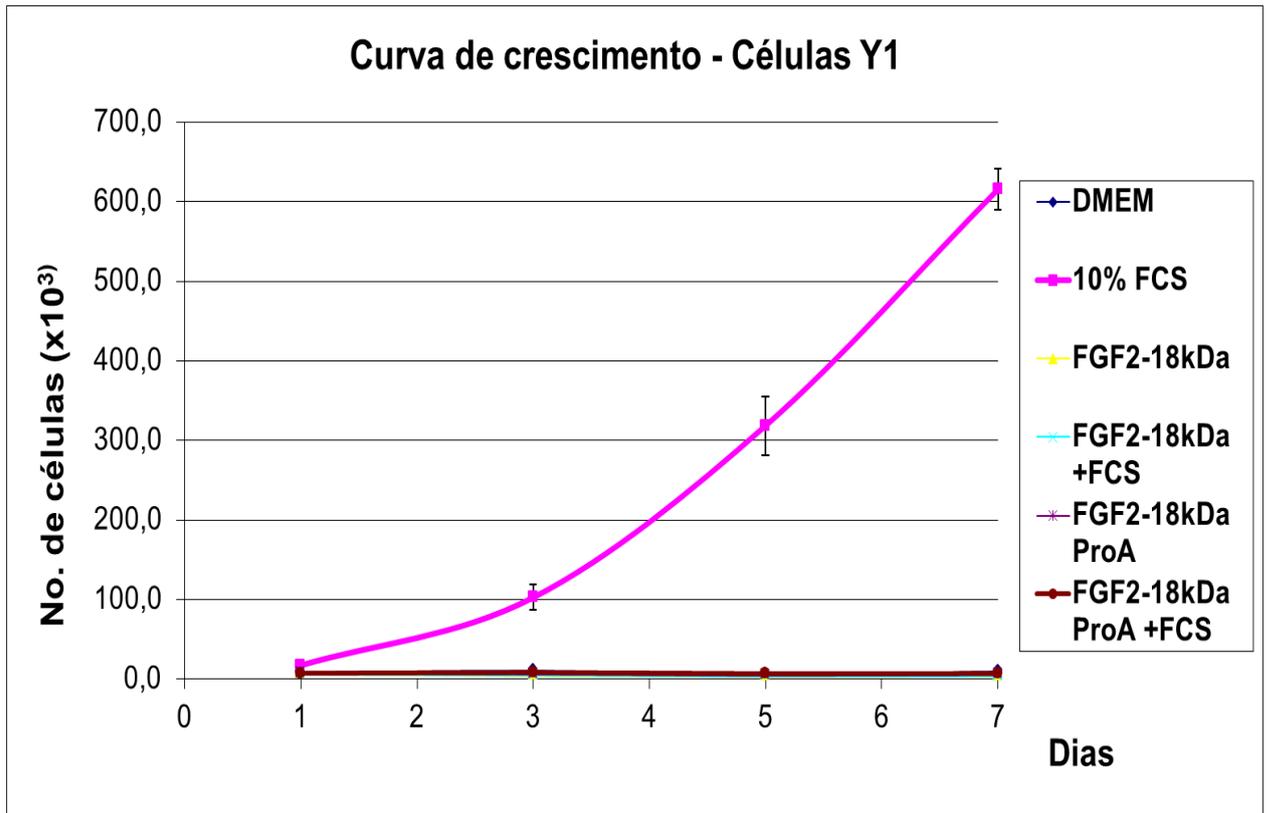


Figure 4.12. FGF2-18kDa inibe a proliferação em células Y1 in vitro, mas His-FGF2-22,5kDa protege as células Curvas de crescimento mostram que His-FGF2-22,5kDa apresenta um efeito inibitório menor (gráfico na parte inferior), comparado com FGF2-18kDa, FCS + FGF2-18kDa (gráfico na parte superior).

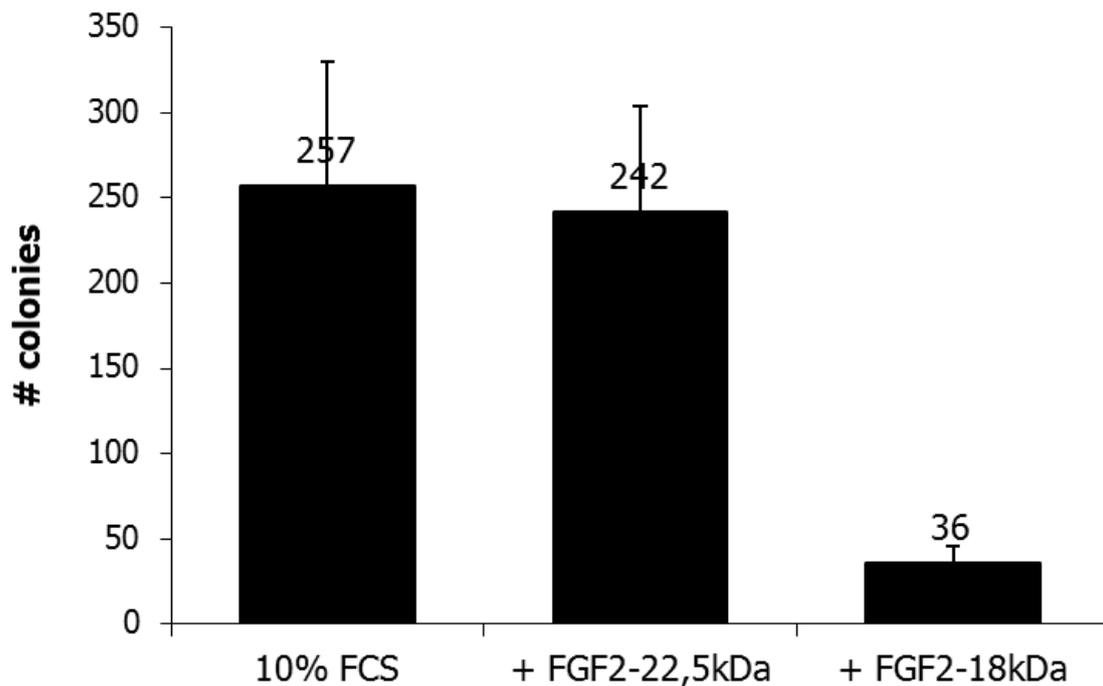


Figura 4.13: Análise de atividade biológica das frações eluídas de FGF2 de 22,5kDa - 10^3 células Y1 são plaqueadas em placas p60, submetidas a diferentes tratamentos (FGF2 de 18 e 22,5kDa, FCS e DMEM) por 24h e mantidas em FCS por 14 dias. A contagem das colônias foram plotadas em gráfico de barras para melhor visualização.

4.2.2.4- Análise de atividade biológica da proteína de fusão His-FGF2-18kDa-ProA - Indução de síntese de DNA, pela incorporação de timidina tritiada

Ao tratarmos células Y1 com His-FGF2-22,5kDa, observamos que as células Y1 não sofrem bloqueio do ciclo celular na fase S, enquanto que quando tratadas com FGF2-18kDa ocorre tal bloqueio (Figura 4.14).

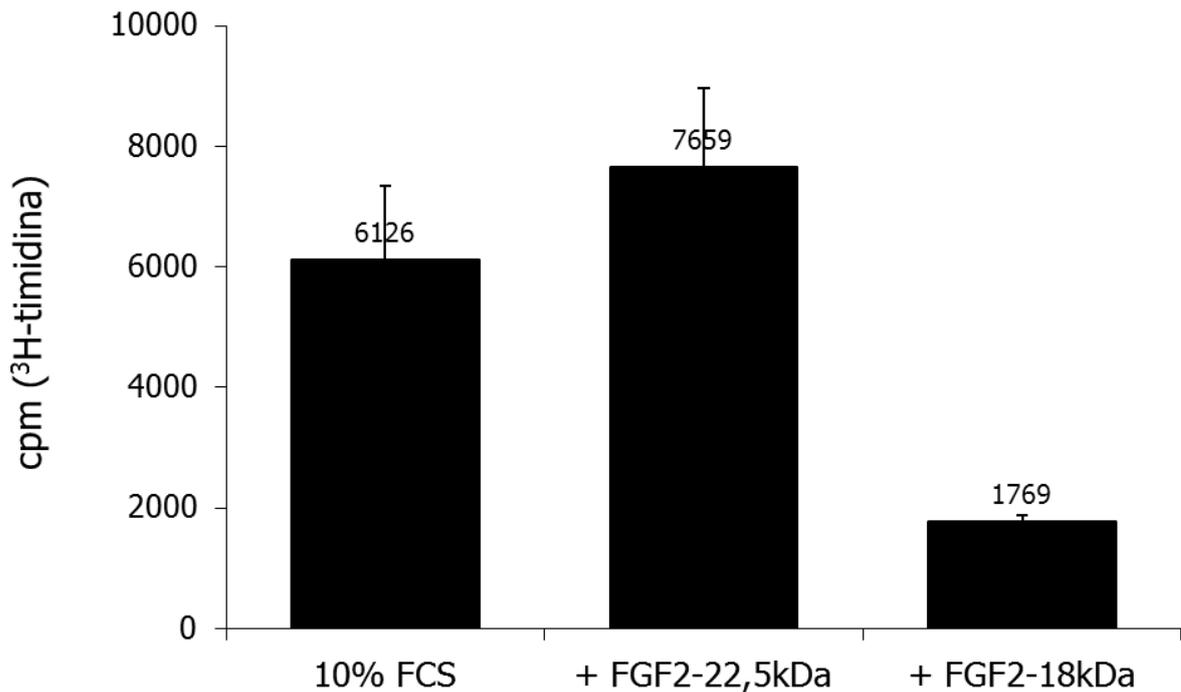


Figura 4.14 Incorporação relativa de timidina tritiada. Células Y1 foram carenciadas e tratadas com FGF2-18KDA e His-FGF2-22,5KDA ou FCS + FGF2, mostrando diferenças significativas na incorporação de timidina tritiada quando comparadas com as células tratadas com FCS.

4.2.3- O His-FGF2-22,5kDa age por mecanismo independente de receptor de FGF

Resultados já publicados do nosso laboratório mostram que a atividade antimitótica de FGF2-18kDa em células malignas Y1 dependentes do oncogene K-ras é totalmente bloqueada pelo inibidor específico da atividade de tirosina-quinase dos FGFRs, PD173074 (Costa et AL, 2008). Através de ensaio de imunocitoquímica, mostramos que o inibidor His-FGF2-22,5kDa que mostraram, através de ensaio de imunocitoquímica, que ocorre a ativação pela fosforilação de

ERK1/2, mesmo com a quinase do receptor inibida por PD173074, mas não quando tratadas com FGF2-18kDa (Figura 4.15).

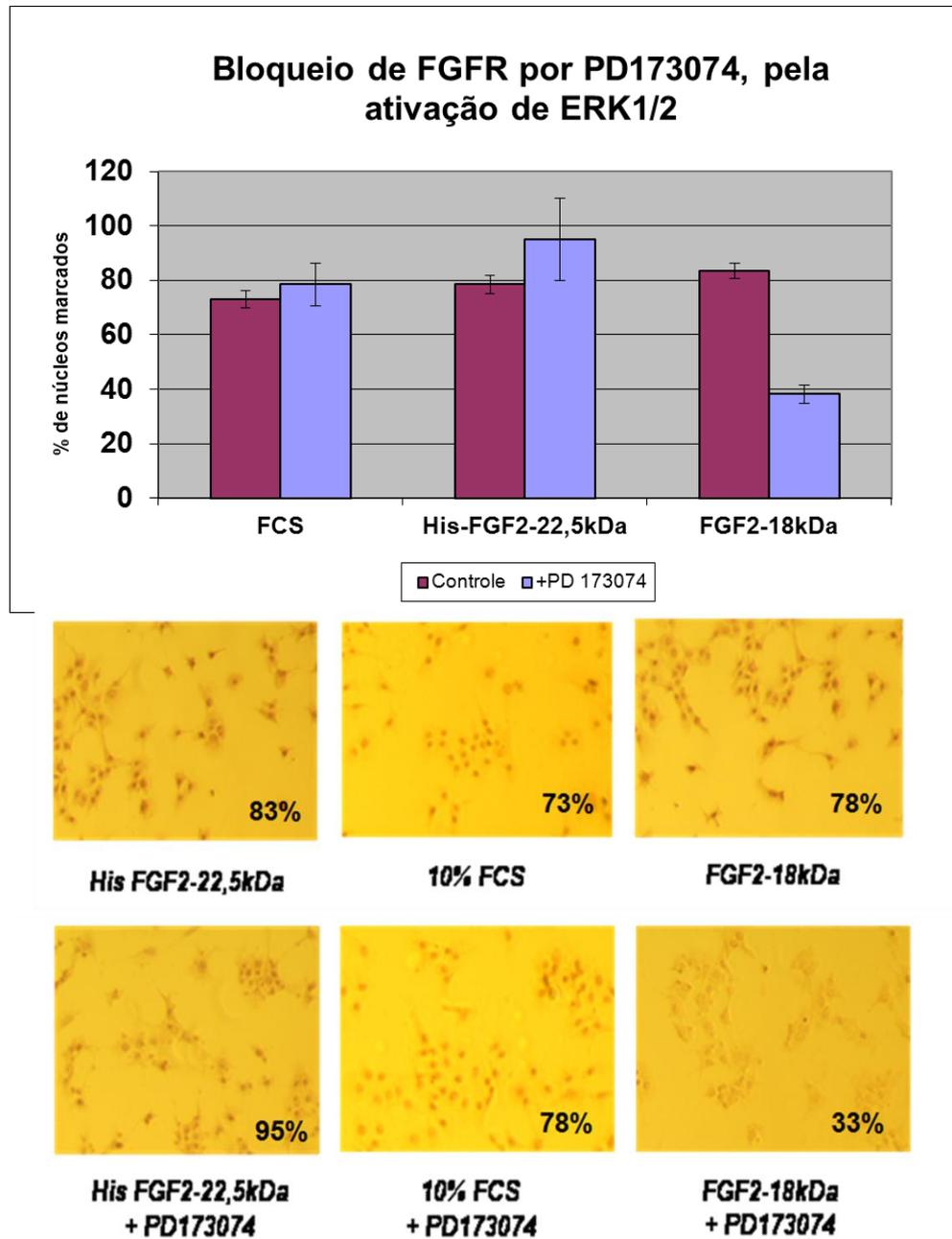


Figura 4.15: Inibidor da quinase do receptor de FGF, PD 173074, não bloqueia atividade de His-FGF2-22,5kDa. Células Y1 carenciadas foram tratadas com PD173074, 60 minutos antes dos tratamentos indicados. Na parte superior da figura, contagem de células marcadas, mostradas em forma de gráfico de barras; e na parte inferior, fotos ilustrativas das células marcadas com anticorpo Anti-ERK total e Anti-ERK fosforilado (p-ERK1/2), mostrando marcação nuclear e citoplasmática e células não marcadas (DMEM).

O resumo das atividades biológicas das proteínas recombinantes estão resumidas na tabela 4.4.

Tabela 4.4- Tabela de atividade biológica em células Y1 disparada pelas proteínas recombinantes

	<i>Ativação de vias mitogênicas</i>	<i>Morte Celular</i>
FGF2-18kDa	+	+
FGF2-18kDa ProA	+	+
FGF2-22,5kDa	+	-
FGF2-22,5kDa ProA	+	+

4.3- Análise de interação física entre FGF2 recombinantes e receptores através de ressonância plasmônica de superfície

4.3.1 - Construção de biosensores- diferentes formas de funcionalização mostram a formação de Bicamada Híbrida (HBM) e Bicamada Lipídica suportada em substrato sólido

Nós construímos um biosensor de HBM pela funcionalização da superfície de ouro dos prismas com 1mM de octanodecano tiol ou 1mM de ácido 11-mercaptoundecanoico (UMA), seguida pela adsorção de vesículas de membrana de células Y1, contendo os receptores de FGF à superfície do prisma de vidro.

A espessura da membrana híbrida formada com o ácido 11-mercaptoundecanoico foi de ~50Å e com Octanodecano tiol foi de ~30Å, pela

presença de proteínas de membrana e cadeias de polissacarídeos ancorados na membrana (Figura 4.16). O ácido 11-mercaptoundecanóico é um substrato polar o que permite a formação de bicamadas integras sobre o prisma; enquanto o octanodecano tiol é apolar, permitindo somente a formação da bicamada híbrida (HBM), uma monocamada de membrana biológica sobre a superfície de hidrocarbonetos tiolados.

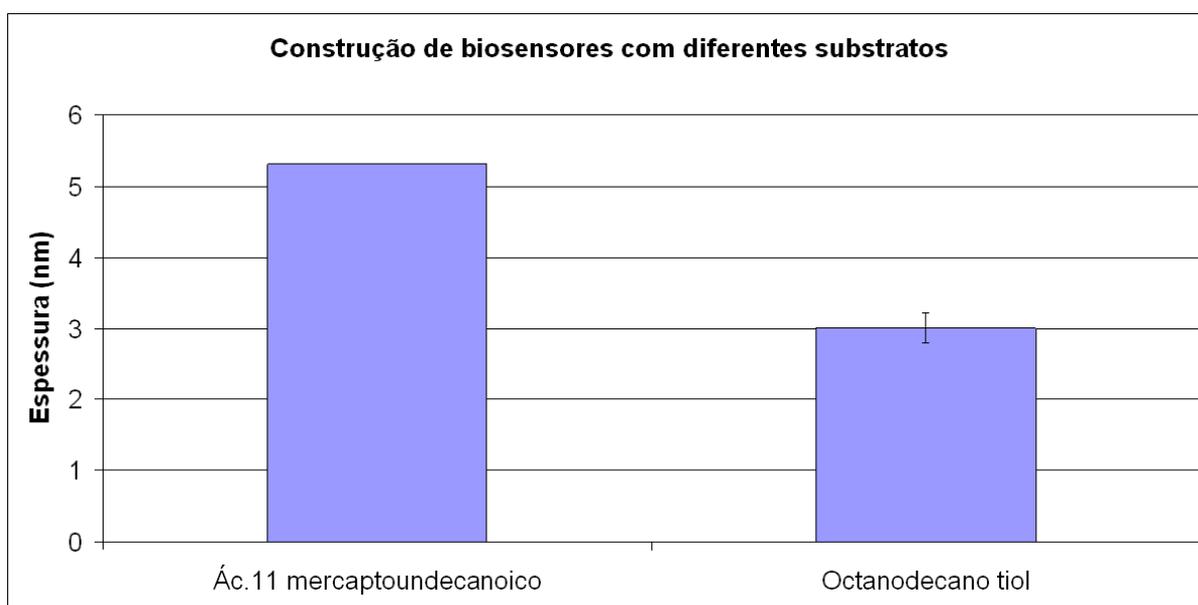


Figura 4.16: Construção de biosensores com diferentes substratos. Prismas de vidro com superfície de ouro foram funcionalizados com ácido 11 mercaptoundecanóico e octanodecano tiol, em etanol, por 24h, lavados com tampão fosfato e vesículas de membrana de células Y1 foram injetadas para formação de bicamadas e bicamadas híbridas, respectivamente.

Após a funcionalização, associação de vesículas de membrana e formação de HBM, o ensaio de associação do ligante ao biosensor foi realizado em ambas as condições (Figura 4.17). O perfil de saturação hiperbólico em ambas as condições demonstrou a integridade da HBM, possibilitando o estudo de ligação FGF2/receptor.

Curva de associação do FGF2-18kDa ao biosensor

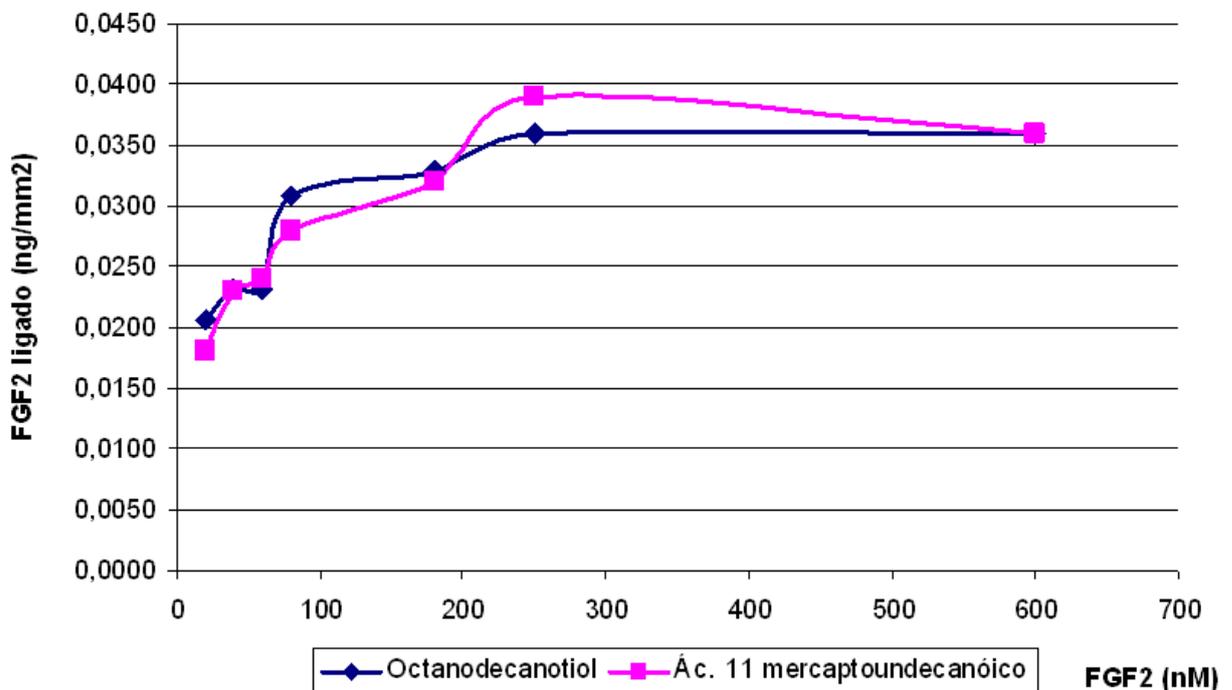


Figura 4.17 Curva de associação FGF2 em biosensores formados por diferentes substratos. Experimentos de SPR mostraram que FGF2-18kDa em diferentes concentrações, em prismas funcionalizados com octanodecano tiol (curva azul) e ácido 11-mercaptoundecanóico (curva rosa), não apresenta diferenças na ligação aos biosensores formados por esses substratos.

Para realização destas curvas de associação, era necessário restaurar o biosensor para as ligações sucessivas de FGF2, em concentrações diferentes. O restauro do biosensor é realizado, lavando-se o sistema com tampão fosfato acrescido de 2M NaCl, pois nesta condição de alta força iônica, ocorre o desligamento do FGF2 ligado ao sensor (IBRAHIMI et al., 2004). Devido a sua maior estabilidade em relação à força iônica, escolhemos utilizar o sistema de bicamada híbrida (HBM).

4.3.2- O Biosensor HBM parece apresentar dois sítios de ligação.

Para estudar a associação do FGF2 aos receptores, nos fizemos uma curva de associação com concentrações de 20 nM até 20 μ M. A figura 4.18, apresenta a curva de associação do FGF2 a HBM, em função da concentração de FGF2 e a quantidade de material adsorvido no biosensor (ng/mm²). Nota-se que a partir de 20 μ M começa a ocorrer ligação inespecífica do FGF2 ao biosensor (Figura 4.18a). Os nossos dados sugerem que a ligação do FGF2 a membranas biológicas, ocorre em dois eventos, pela presença de dois sítios de ligação: o primeiro com alta afinidade, na faixa de nanomolar ($K_d=2,2\pm 0,3\times 10^{-8}$ M e $V_{max} 0,04\pm 0,01$ ng/mm²), mostrando rápida saturação e menor quantidade de material adsorvido (Figura 4.18b); e um segundo sitio, de baixa afinidade, na faixa de micromolar ($K_{d_2} 1,8\pm 0,2\times 10^{-6}$ M e $V_{max} 0,26\pm 0,03$ ng/mm²), o que mostra uma maior quantidade de FGF2 adsorvido (Figura 4.18a).

A presença de dois sítios distintos de ligação é bem visualizada num plot de Scatchard (Figura 4.18c) que mostra dois sítios ligante-receptor. Estes dados estão em concordância com dados da literatura que sugerem uma ligação específica do FGF2 ao seu receptor (FGFR, com alta afinidade) e um de baixa afinidade a Heparan Sulfato Proteoglicanas (HSPG).

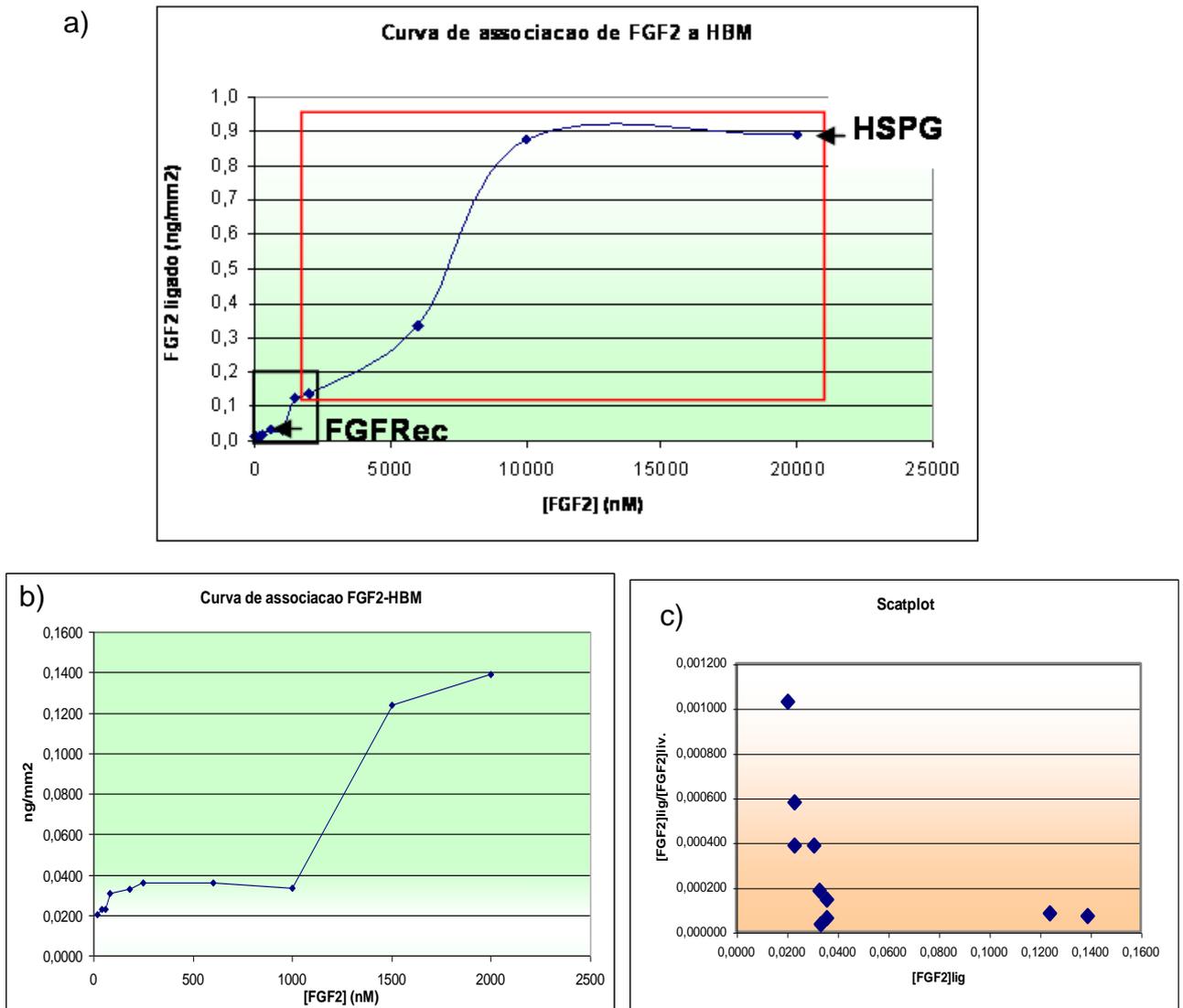


Figura 4.18 Curva de associação FGF2-HBM. Experimentos de SPR mostraram ligação diferenciada de FGF2 a) Curva de dose FGF2-18KDA em diferentes concentrações variando de a) 20nM a 25 μ M b) 20nM a 2 μ M c) Análise de Scatchard da curva de associação de His-FGF2-22,5kDa-HBM mostrado em b), mostrando dois sítios de ligação do FGF2 ao HBM.

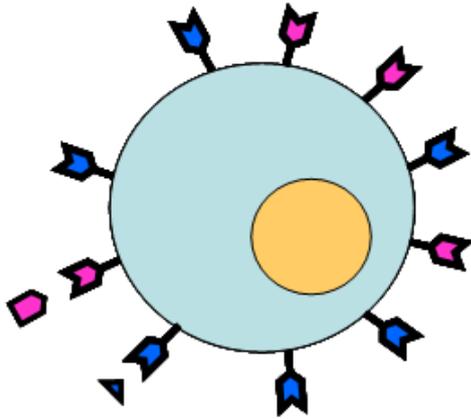
4.3.3- Curvas de associação de FGF2-18kDa e His-FGF2-22,5kDa mostram diferenças na ligação ao HBM biosensor

Fizemos uma curva de associação dos FGF2-18kDa e His-FGF2-22,5kDa, com concentrações crescentes de ambos os FGF2s (20 a 450nM)., onde observamos que His-FGF2-22,5kDa (pontos em rosa, Figura 4.19a) se liga com menos afinidade ao biosensor quando comparado com FGF2-18kDa (pontos em azul, Figura 4.19a); e através do gráfico de Scatchard, onde a inclinação da reta é igual a $-1/K_d$ e a concentração de saturação de ligação é o valor em que a reta toca no eixo da abscissa (x). (Figura 4.19b). Os valores das constantes obtidos pelo gráfico de Scatchard são para o FGF2-18kDa: $K_{d_{18}}: 2,3 \pm 0,2 \times 10^{-8}$ e para o His-FGF2-22,5kDa: $K_{d_{22,5}} : 2,1 \pm 0,2 \times 10^{-8}$, que estão próximos aos obtidos pelo software Origin7.0 (One bind site analysis) mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.5 – Comparação das constantes de afinidade obtidas por diferentes métodos.

		K_D	ng/mm ²	Moléculas/mm ²
FGF2-18kDa	Scatchard	$2,3 \pm 0,2 \times 10^{-8}$	$0,0385 \pm 0,04$	
	Origin	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-8} M$	$0,04 \pm 0,01$	$2,2 \times 10^{-15}$
His-FGF2-22,5kDa	Scatchard	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{-8}$	$0,0269 \pm 0,02$	
	Origin	$2,4 \pm 0,3 \times 10^{-8}$	$0,027 \pm 0,001$	1.1×10^{-15}

Gilson, importante: V_{max} está errado e não foi corrigido, nem no texto e nem na Tabela, pode ser colocado em termos de $(ng/mm^2)_{máximo}$, conforme a Tabela que você mostrou na apresentação, no início da defesa de tese.



$$k_{eq} \sim k_{eq}$$

$$\Gamma \sim 2\Gamma$$

Γ = Densidade superficial
(Quantidade de receptor)

Figura 4.19 – Hipótese de interação do FGF2 à membrana biológica. A partir dos resultados de interação física, infere-se que as constantes de associação entre o His-FGF2-22,5kDa e FGF2-18kDa são bastante próximos ($2,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-8}M$) e a quantidade de receptores (Γ) para o His-FGF2-22,5kDa é duas vezes maior do que o do FGF2-18kDa.

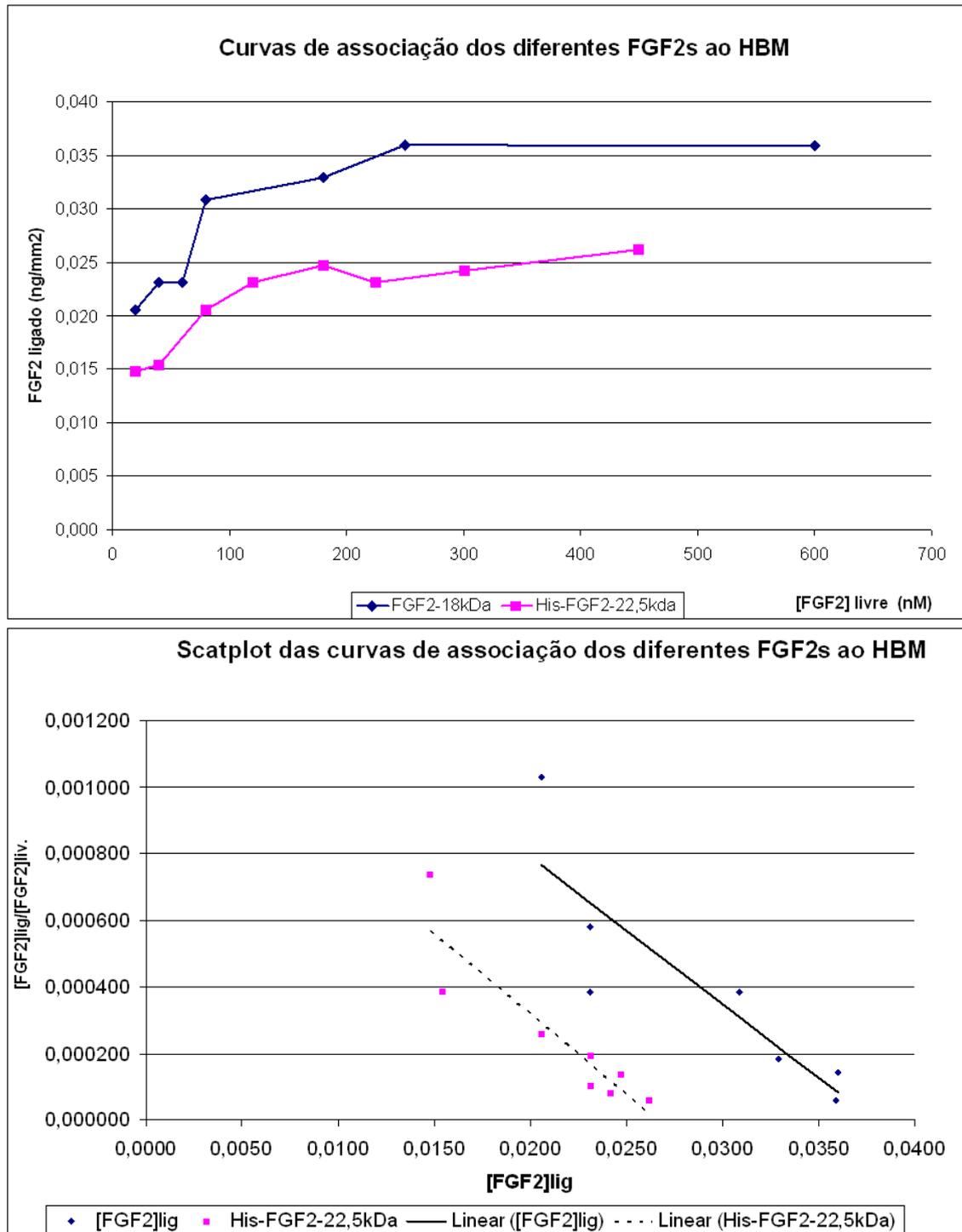


Figura 4.20 Curva de associação FGF2-HBM. Experimentos de SPR mostraram ligação diferenciada de FGF2 (FGF2-18kDa e His-FGF2-22,5kDa) em diferentes concentrações. **Esquerda-** Curva de associação FGF2-18kDa-HBM e His-FGF2-22,5kDa-HBM mostra que a isoforma de alto peso molecular liga menos do que a de baixo peso molecular. **Direita-** Análise de Scatchard das curvas de associação, mostram diferenças de ligação entre as isoformas. **Abaixo-** Dados da curva de associação FGF2-HBM obtidos por SPR.

5. DISCUSSÃO

5.0 Considerações preliminares.

Conforme já afirmado no item Objetivos o foco original desta tese foi o estudo experimental comparativo da relação estrutura/função entre o FGF2-18kDa e o FGF2-22,5kDa. Motivados pela análise estrutural realizada por Alexandre Dermargos e Sérgio Oyama, que utilizando a técnica de modelagem molecular, mostraram que a alça adicional de 55 resíduos de aminoácidos (N-terminal) do FGF2-22,5kDa não interfere na estrutura 3D de barril β presente no FGF2. Por conseqüência o FGF2-22,5kDa deveria interagir com os FGFRs, pois não há impedimento estérico para esta ligação; embora as atividades biológicas parácrinas de cada um deles pudessem ser diferentes (DERMARGOS, 2007; Fig. 5.1). O plano experimental deste trabalho foi inicialmente desenhado para testar conclusivamente estas hipóteses e consistia das seguintes etapas: i) produção de formas recombinantes de FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa previamente planejadas; ii) teste comparativo de atividade parácrina mitogênica e/ou citotóxica dessas formas recombinantes em linhagens celulares especificamente escolhidas; iii) testes de ligação destas formas recombinantes com seus putativos receptores, particularmente com os FGFRs autênticos, sem dúvida presentes nas células alvo previamente escolhidas.

As etapas deste plano foram de fato perseguidas e na maior parte cumpridas, apesar dos empecilhos práticos não previstos que surgiram no desenvolvimento do projeto. Os resultados conseguidos são instigantes e de interesse potencial grande.

Na abertura desta Discussão cabe enfatizar que o FGF2 apresenta singularidades quase únicas dentro da família FGF, possui uma isoforma de ação

parácrina e autócrina (FGF2-18kDa), mas, também, outras de ação intrácrina (isoformas intracelulares de alto peso molecular). Somente o FGF2-18kDa, através do eixo de sinalização FGF2-18kDa/FGFRs, tem efeitos biológicos e uma sinalização molecular bem conhecidos. Por outro lado, as isoformas intracelulares de alto peso molecular permanecem sem funções biológicas definidas e sem circuitos sinalizadores estabelecidos. Nesta visão, o presente estudo comparativo entre FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa possui indiscutível relevância biológica maior.

5.1. Produção das isoformas recombinantes de FGF2: problemas e soluções.

Sabidamente, o rendimento na produção e isolamento de proteínas recombinantes depende de regras empíricas de limitada generalização. O FGF2-18kDa recombinante é produzido em nosso laboratório há muitos anos, tendo sido originalmente desenvolvido por Ângelo Gambarini e Catarina Miyamoto. (MIYAMOTO, 1992). A diferença importante entre FGF2-18kDa e His-FGF2-22,5ProA ou His-FGF2-22,5kDa é a porção aminoterminal de FGF2-22,5kDa com 13 argininas e a presença desta porção N-terminal eleva o pI de 9,58 (FGF2-18kDa) para 10,26 no His-FGF2-22,5kDa. Esta elevação de pI torna o FGF2-22,5kDa muito pouco solúvel durante a síntese em bactéria, levando a formas insolúveis em corpúsculos de inclusão. Este fato está de acordo com as observações de Niwa et al., 2009, mostrando que quanto maior o pI, menor a solubilidade das proteínas recombinantes. Para contornar estas dificuldades práticas e melhorar o rendimento das preparações dos recombinantes de FGF2-22,5kDa de interesse testamos múltiplas sugestões existentes na literatura da área.

Uma estratégia adotada para aumentar a solubilidade do FGF2 foi à indução em resposta ao choque térmico (HOFFMAN e RINAS, 2000), que leva à indução de chaperonas, no caso DnaK, que auxilia no dobramento correto da proteína de interesse. Utilizamos então, bactérias Arctic (Stratagene) que expressam as chaperonas HSP10 e HSP70, que mostrou uma maior quantidade de His-FGF2-22,5kDa solúvel (Figura 4.6), porém, junto com as frações eluídas de His-FGF2-22,5kDa, as chaperonas estavam presentes, provavelmente ligadas à proteína solúvel.

Apesar das múltiplas tentativas não encontramos a receita ideal e o rendimento das preparações dos recombinantes de FGF2-22,5kDa permaneceu baixo, limitando os experimentos de ensaio biológico e de interação física por SPR.

5.2- As proteínas O His-FGF2-22,5kDa ProA, His-FGF2-22,5kDa, FGF18kDa e His FGF2-18kDa ProA disparam vias mitogênicas em células Y1, através da fosforilação de ERK1/2, indução de síntese de c-FOS e proliferação celular através de curvas de crescimento.

As células Y1, quando tratadas com FGF2-18kDa, iniciam uma resposta mitogênica, com rápida ativação de ERK1/2, indução de genes de resposta primária e síntese da proteína c-Fos, c-Jun e c-Myc (LEPIQUE et.al, 2000). Recentemente o nosso laboratório mostrou que FGF2-18kDa também dispara uma resposta antagônica: a indução de senescência celular, bloqueando o ciclo celular na fase S (COSTA et al., 2008). Este efeito antagônico também é obtido quando utilizamos His-FGF2-18kDaProA.

Os resultados sugerem que a estrutura terciária do FGF2-18kDa (de barril β) se mantém essencialmente intacta mesmo quando fusionado a domínios protéicos grandes, como proteína A na porção carboxi terminal, e também, quando fusionado à cauda de 6 histidinas + linker na porção amino terminal, fato que permite perfeita ligação aos FGFRs.

Estudos de modelagem molecular do FGF2-22,5kDa, realizados por Alexandre Dermargos (DERMARGOS, 2007 - dados não publicados), mostraram que a presença da porção aminoterminal do FGF2-22,5kDa, não presente na isoforma de 18kDa, não altera a estrutura terciária de barril β (Circulo vermelho na Figura 5.1). Apesar de não alterar a estrutura, o FGF2-22,5kDa não apresenta as respostas antagônicas em células Y1, disparadas por FGF2-18kDa: His-FGF2-22,5kDa ativa somente as vias mitogênicas: i) ativação de ERK1/2; ii) indução de síntese de c-Fos (Figura 4.9); iii) aumento da síntese de DNA (Figura 4.14); iv) indução da proliferação celular (Figura 4.12); e v) crescimento de colônias (Figura 4.13). A presença do N-terminal fortemente carregado positivamente, pode alterar a afinidade do His-FGF2-22,5kDa aos FGFRs, pois estes apresentam uma região muito carregada positivamente, que é o sítio de ligação a heparina (PLOTNIKOV et al., 1999).

Por outro lado, quando fusionamos ao His-FGF2-22,5kDa o domínio de ligação da Proteína A (ProA), os efeitos antimitóticos, ou seja a indução da senescência celular, com a parada do ciclo celular na fase S, são recuperados. Portanto, o His-FGF2-22,5kDaProA mimetiza perfeitamente FGF2-18kDa, disparando respostas antagônicas nas células malignas Y1. Esses dados sugerem que o “tag” da proteína A pode estar auxiliando a proteína His-FGF2-22,5kDaProA a se ligar ao FGFR.

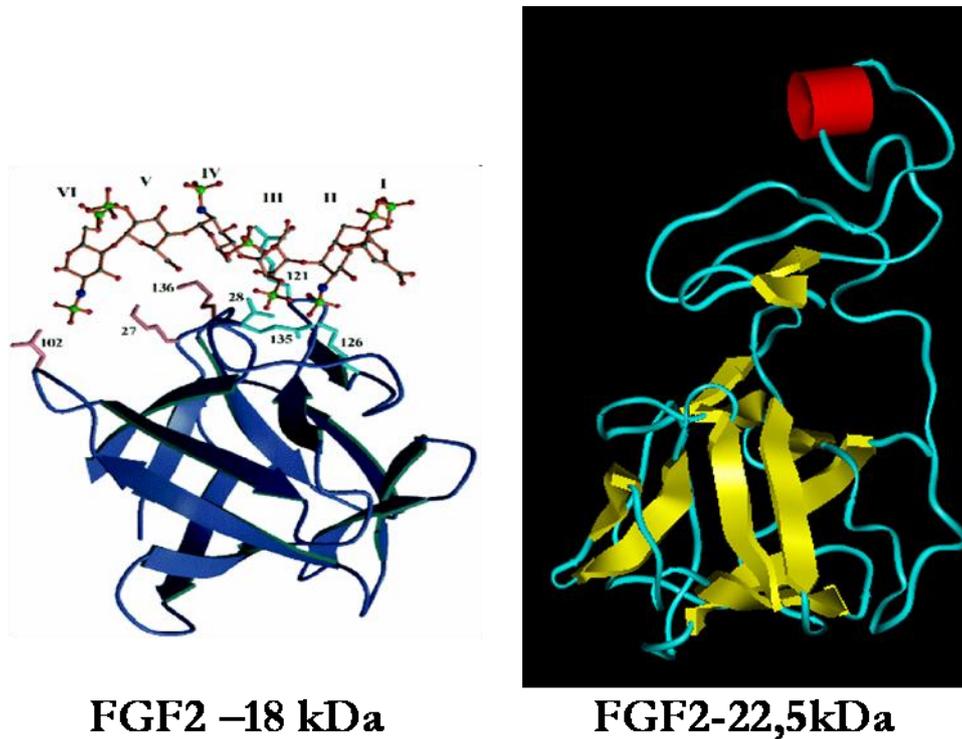


Figura 5.1- Comparação entre as estruturas do FGF2-18kDa e o FGF2-22,5kDa A esquerda temos a estrutura do FGF2-18kDa determinada por RNM (Waksman & Herr, 1998.) e a esquerda, a estrutura do FGF2-22,5kDa obtida através de modelagem molecular (imagem cedida por Alexandre Dermargos), observa-se que em ambas as estruturas a presença do barril β se mantém, independente da presença ou não do N-terminal, existente no FGF2-22,5kDa.

Os efeitos antagônicos apresentados por FGF2-18kDa, His-FGF2-18kDaProA e His-FGF2-22,5kDaProA podem estar relacionados à ligação e ativação de receptores específicos. Dados do nosso laboratório mostram que células Y1 expressam majoritariamente FGFR1 e FGFR5, e em menor quantidade FGFR2. Células Balb3T3 transfectadas com FGFR1 tratadas com FGF2-18kDa apresentam morte celular, sugerindo que o FGFR1 é quem dispara a via de morte celular (SALLOTI, 2009 - dados não publicados). O outro receptor, o FGFR5, não apresenta atividade, pela ausência da porção tirosina quinase intracelular (SLEEMAN et al., 2005).

Utilizamos o inibidor específico da quinase dos receptores de FGF, PD173074, onde todos os efeitos das formas de FGF2-18kDa foram bloqueados pelo inibidor, demonstrando que são respostas intermediadas pelos FGFRs. Por outro lado, o recombinante His-FGF2-22,5 dispara apenas as vias de sinalização mitogênica, mas este efeito não é inibido pelo inibidor da quinase dos FGFRs, PD173074, sugerindo que o His-FGF2-22,5kDa não age via FGFRs (Figura 4.15).

Este trabalho é de grande importância devido a poucos dados publicados sobre o FGF2-22,5kDa recombinante (PATRY et al, 1994). Nossos dados preenchem lacunas sobre a ação do FGF2-22,5kDa em células malignas que permite concluir que FGF2-22,5kDa protege as células do efeito citotóxico de morte celular, promovido pelo FGF2-18kDa.

5.3. Interação física entre as isoformas recombinantes de FGF2 e receptores putativos: relevância biológica e limitações da abordagem por SPR.

A metodologia clássica para medir afinidade (K_D) entre ligante e receptor é através da marcação do ligante com o isótopo radiativo de iodo. Esta metodologia foi utilizada por Chellaiah et al (1999) que analisou a ligação de FGF2 iodinado (^{125}I -FGF2) às células COS-7 e supostamente mediu a formação do complexo ternário FGF2-FGFR-HSPG. Neste trabalho os autores chegaram a um $K_D=3,8\pm 0,9\times 10^{-11}\text{M}$ para o complexo FGF2-18kDa/FGFR, valor que é cerca de 1000 vezes inferior aos valores de K_D que determinamos para os recombinantes tanto de FGF2-18kDa, como de FGF2-22,5kDa através da técnica de SPR. Esta enorme discrepância entre as medidas de K_D do grupo de Chellaiah e as nossas

determinações, se deve, provavelmente, as grandes diferenças metodológicas usadas.

Utilizamos dois substratos diferentes na construção dos biosensores, o octadecanotiol, bastante usado na construção de bicamadas híbridas de membrana (MEUSE et al., 1998; SURANITI et al., 2007) e o ácido 11-mercaptoundecanóico (UMA) (JORDAN et al., 1994), que permite a formação de bicamadas “íntegras” de membrana biológica sobre a sua superfície polar, com chances de preservar a fluidez característica das membranas e, também o estado nativo das proteínas integrais da membrana. Comparamos a ligação do FGF2-18kDa às superfícies das preparações de membranas construídas sobre estes dois tipos de biosensores. Mas, apesar da grande diferença estrutural entre eles, observamos curvas de associação do FGF2-18kDa praticamente coincidentes em ambos os casos (Figura 4.17). Estes resultados mostraram que a ligação do FGF2-18kDa à superfície da preparação independe do modelo de bicamada construída em cada tipo de biosensor.

Cabe destacar que há poucos artigos na literatura especializada para medir a interação física entre FGF2 e FGFR através de SPR. Mas, não encontramos nenhum que tenha procurado fazer preparações de membrana biológica sobre biosensores à semelhança de nossa abordagem. Peelen et al., (2008) imobilizou o FGF2 no prisma e injetou células BHK sobre o sistema. Ibrahimi et al. (2004) imobilizou os domínios de ligação do FGFR (D2-D3) e injetou o FGF2 e heparina para desenvolver modelos de cinética de associação. Aparentemente, o trabalho desenvolvido para esta tese foi o primeiro a usar os modelos experimentais de membrana híbrida e de bicamada íntegra de membrana, preparados a partir de vesículas microssomais, para medir a interação física de FGF2 com seus receptores

putativos. O enorme potencial desta técnica é inegável, mas, ainda não podemos afirmar que os sítios de ligação de FGF2 detectados neste trabalho sejam os autênticos FGFRs do eixo de sinalização biológica FGF2/FGFR.

Apesar das limitações apontadas, nossa abordagem por SPR revelou que FGF2-18kDa e FGF2-22,5kDa se ligam aos seus putativos receptores com K_D s praticamente iguais, embora o número de sítios ligantes para FGF2-22,5kDa seja muito inferior ao número de sítios de FGF2-18kDa, nas preparações originárias das células malignas Y1. Estes resultados são compatíveis com receptores distintos para ambas as formas de FGF2, embora seja esta uma conclusão apenas tentativa.

6. CONCLUSÕES

1) Os domínios adicionais das formas recombinantes de FGF2-18kDa, cauda de His e ProA, não impedem que estas proteínas de fusão se liguem e ativem os FGFRs.

2) A seqüência de 55 resíduos do FGF2-22,5kDa, ausente no FGF2-18kDa, com alta freqüência de aminoácidos básicos, no lado N-terminal do FGF2-22,5kDa pode impedir que esta espécie de FGF2 se ligue e/ou ative os FGFRs. Esta sugestão implica que as espécies intracelulares de FGF2 podem seguir circuitos de sinalização independentes das vias de sinalização ativadas pelo eixo parácrino/autócrino FGF2-18kDa/FGFR.

3) His-FGF2-22,5ProA mimetiza bem o FGF2-18 disparando respostas biológicas antagônicas, isto é, ativa as vias mitogênicas mas bloqueia o ciclo celular. As implicações destes últimos resultados é que o domínio de ProA adicionado ao C-terminal torna o FGF2-22,5 um bom ligante dos FGFRs.

Em resumo, o FGF2-18kDa, mesmo em formas recombinantes como proteína de fusão, dispara todos os efeitos descritos para FGF2, particularmente em células malignas dependentes do oncogene K-ras, através dos FGFRs. Diferentemente, o FGF2-22,5kDa só desencadeou a resposta mitogênica clássica de FGF2, provavelmente através de receptores diferentes dos FGFRs. Apesar deste trabalho não ter resolvido as vias sinalizadoras moleculares subjacentes à fenomenologia aqui descrita, os resultados e conclusões desta tese tem um potencial indiscutivelmente relevante para a biologia molecular do câncer, com implicações possíveis em terapia oncológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AARONSON SA, TODARO GJ. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol.* 1968 Oct;72(2):141-148.

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

ARESE M, CHEN Y, FLORKIEWICZ RZ, GUALANDRIS A, SHEN B, RIFKIN DB. Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol Biol Cell.* 1999 May;10(5):1429-44.

ARMELIN, H. A. . Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, v. 70, p. 2702-2706,

ARNAUD E, TOURIOL C, BOUTONNET C, GENSAC MC, VAGNER S, PRATS H, PRATS AC. A new 34-Kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol.* 1999;19:505-14.

BASILICO, C., AND MOSCATELLI , D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* 1992 , 59: 115-165

BERNFIELD M, GOTTE M, PARK PW, REIZES O, FITZGERALD ML, LINCECUM J, ZAKO M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 729 -77.

BIKFALVI A, KLEIN S, PINTUCCI G, QUARTO N, MIGNATTI P, RIFKIN DB. Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J Cell Biol.* 1995;129:233-43.

BIKFALVI, A. KLEIN, S., PINTUCCI, G., AND RIFKIN, D. B. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2 - *Endocrine Reviews*, 1999 18 (1): 26-45

BUGLER B, AMALRIC F, PRATS H. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol.*, 1991, 11: 573-577

BURGESS, W. H.; MACIAG, T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.*, 58, 575-606, 1989.

CASTELLANA, E.T.; CREMER, P.S.; Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science reports*, 2006 (61) 429-444

CHELLAIAH, A; YUAN W, CHELLAIAH M, ORNITZ D M "Mapping ligand binding domains in chimeric fibroblast growth factor receptor molecules. Multiple regions determine ligand binding specificity". *J. Biol. Chem.* 1999, 274 (49): 34785–94.

CHOI J, KO MK, KAY EP. Subcellular localization of the expressed 18 kDa FGF-2 isoform in corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 2000;6:222-31.

CLARKE, M.S.F., KHAKEE, R. AND MCNEIL, P.L. (1993) Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal dystrophic muscle. *Journal of Cell Science* 106, 121-133.

COSTA ET, FORTI FL, MATOS TG, DERMARGOS A, NAKANO F, SALOTTI J, ROCHA KM, ASPRINO PF, YOSHIHARA CK, KOGA MM, ARMELIN HA., Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6215-23.

COSTA, E. T. Ações antagônicas de FGF2 em células tumorais de camundongo:disparo de mitogênese e de morte celular. 2005. 133p. Tese. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CUEVAS, P., J., BURGOS, AND A. BAIRD Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 156: 611-618.

CRISTOFALO VJ, LORENZINI A, ALLEN RG, TORRES C, TRESINI M. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev.* 2004 Oct-Nov;125(10-11):827-48.

DERMARGOS, A. FGF2: estudo de estrutura e função. 2007. 156p. Tese. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

DIETRICH CP, TERSARIOL IL, TOMA L, MORAES CT, PORCIONATTO MA, OLIVEIRA FW AND NADER HB. Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparin sulfates of different origins. *Cell Mol Biol (Noisyle-grand)* 1998. 44: 417–429.

DUAN DS, WERNER S, WILLIAMS LT. A naturally occurring secreted form of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 binds basic FGF in preference over acidic FGF. *J Biol Chem.* 1992;267:16076-80.

ERIKSSON, A.; COUSENS, L.S.; WEAVER, L.H.; MATTHEWS, B.W. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(8), 3441-5

FEIGE JJ, BAIRD A. Basic fibroblast growth factor is a substrate for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3174-8.

FLORKIEWICZ RZ, ANCHIN J, BAIRD A. The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 1998;273:544-51.

GALZIE Z, KINSELLA AR AND SMITH JA . Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem. Cell Biol.* 1997, 75: 669-685.

GAMBARINI AG, MIYAMOTO CA, LIMA GA, NADER HB, DIETRICH CP. Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Mol Cell Biochem.* 1993 Jul 21;124(2):121-9.

GOSPODAROWICZ D. "Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth". *Nature*, 1974, 249 (453): 123–7

GOSPODAROWICZ, D., MORAN J.S., Stimulation of Division of Sparse and Confluent 3T3 Cell Populations by a Fibroblast Growth Factor, Dexamethasone, and Insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 November; 71(11): 4584–4588.

HOFFMANN, F., RINAS, U., Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 1000-1007.

HSIA E, RICHARDSON TP, NUGENT MA. Nuclear localization of basic fibroblast growth factor is mediated by heparan sulfate proteoglycans through protein kinase C signaling. *J Cell Biochem.* 2003;88:1214-25.

HUBBARD JB, SILIN V, PLANT AL. Self assembly driven by hydrophobic interactions at alkanethiol monolayers: mechanisms of formation of hybrid bilayer membranes. *Biophys Chem.* 1998 Dec 14;75(3):163–176

IBRAHIMI, O.A., ZHANG, F., HRSTKA, S.C.L., MOHAMMADI, M. LINHARD, J. Kinetic Model for FGF, FGFR and proteoglycan signal transduction complex assembly *Biochemistry* 2004, 43, 4724-4730

ITOH N.; ORNITZ, D. *Trends in genetics*, 2004, 20(11):563-9.

JAYE, M.; SCHLESSINGER, J.; DIONNE, C. A. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*, 1135 (2), 185-99, 1992.

JOHNSON S.J., BAYERL T.M., MCDERMOTT D.C., ADAM G.W. RENNIE A.R., THOMAS R.K., SACKMANN E., Structure of an adsorbed dimyristoylphosphatidylcholine bilayer measured with specular reflection of neutrons. *Biophys. J.* 59 (1991) 289.

KANDUC D, MITTELMAN A, SERPICO R, SINIGAGLIA E, SINHA AA, NATALE C, SANTACROCE R, DI CORCIA MG, LUCCHESI A, DINI L, PANI P, SANTACROCE

S, SIMONE S, BUCCI R, FARBER E. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol.* 2002 Jul;21(1):165-70.

LEE, S.Y., High cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 1996,14, 98-105.

LEFEBVRE BG, GAGE MJ AND ROBINSON AS. Maximizing recovery of native protein from aggregates by optimizing pressure treatment. *Biotechnol Prog* 2004, 20: 623–629.

LEPIQUE AP, FORTI FL, MORAES MS, ARMELIN HA. Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocr Res*, 2000,26(4):825-32.

MANIATS, T., (1989) "Molecular Cloning- a laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MEUSE, C.W., NIAURA, G., LEWIS, M.L., PLANT, A.L., Assessing the molecular structure of alkanethiol monolayers in hybrid bilayer membranes with vibrational spectroscopies, *Langmuir* 14 (1998), pp. 1604–1611.

MIGNATTI P, MORIMOTO T, RIFKIN DB. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol.* 1992 Apr;151(1):81-93.

MIYAMOTO, C. A. Produção e caracterização de fibroblast growth factor (fgf) recombinante. 1992. 79p. Dissertação. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

MOSCATELLI D., Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. Implications for mechanisms of bFGF release from pericellular matrix., *J Biol Chem.* 1992 Dec 25;267(36):25803-9.

MOY FJ, SEDDON AP, BOHLEN P, POWERS R. High-resolution solution structure of basic fibroblast growth factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry.* 1996;35:13552-61.

NADER HB, DIETRICH CP, BUONASSISI V AND COLBURN P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan., *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 3565–3569.

NADER HB ET AL.. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? *Braz J Med Biol Res* 1999a 32:529–538.

NIWA T, YING BW, SAITO K, JIN W, TAKADA S, UEDA T, TAGUCHI H. Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of *Escherichia coli* proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 17;106(11):4201-6.

NUZZO R.G., ALLARA, D.L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4481.

ORNITZ D.M., XU J, COLVIN JS, MCEWEN DG, MACARTHUR CA, COULIER F, GAO G, GOLDFARB M (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271(25):15292-7.

ORNITZ D.M. "FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development" *Bioessays*, 2000, 22:108-112.

ORNITZ D.M., ITOH N Fibroblast growth factors. *Genome Biology* (2001). 2(3):3005.1-12.

ORNITZ D.M., YAYON A, FLANAGAN JG, SVAHN CM, LEVI E, LEDER P 1992 Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* 12:240–247

ORNITZ DM, XU J, COLVIN JS, MCEWEN DG, MACARTHUR CA, COULIER F, GAO G, GOLDFARB M 1996 Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15292–15297

PASQUALE, E.B.; SINGER, S.J.; Identification of a developmentally regulated protein-tyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(14), 5449-53

PATRY V, BUGLER B, AMALRIC F, PROME JC, PRATS H. Purification and characterization of the 210-amino acid recombinant basic fibroblast growth factor form (FGF-2) - *FEBS Lett.* 1994 Jul 25;349(1):23-8

PEELEN D, KODOYIANNI V, LEE J, ZHENG T, SHORTREED MR, SMITH LM. Specific Capture of Mammalian Cells by Cell Surface Receptor Binding to Ligand Immobilized on Gold Thin Films *J. Proteome Res.*, 2006, 5 (7), pp 1580–1585

PLANT AL. Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold *Langmuir.* 1993;9:2764

PLANT AL, BRIGHAM-BURKE M, PETRELLA EC, O'SHANNESY DJ. Phospholipid/alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance. *Anal Biochem.* 1995 Apr 10;226(2):342–348.

PLOTNIKOV AN, SCHLESSINGER J, HUBBARD SR, MOHAMMADI M. - Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell.* 1999 Sep 3;98(5):641-50.

POWERS CJ, MCLESKEY SW, WELLSTEIN A Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 2000, 7:165-97.

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

PRATZ, H. PRATS H, KAGHAD M, PRATS AC, KLAGSBRUN M, LÉLIAS JM, LIAUZUN P, CHALON P, TAUBER JP, AMALRIC F, SMITH JA, "High molecular mass forms of basic fibroblast factor are initiated by alternative CUG codons" Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 1989,(86)1836-1840;

QUARTO N, FINGER FP, RIFKIN DB. The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. J Cell Physiol. 1991;147:311-8.

RE RN. The intracrine hypothesis and intracellular peptide hormone action. Bioessays 25: 401–409, 2003.

RE RN, COOK JL. The intracrine hypothesis: an update. Regul Pept 133: 1–9, 2006.

RENKO, M.; QUARTO, N.; MORIMOTO, T. et al. Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. J. Cell. Physiol. 1990, v.144, p.108-114

RIFKIN, D. B. AND MOSCATELLI M.. Recent developments, in the cell biology of basic fibroblast growth factor. J. Cell Biol., 1989, 109, 1-6.

ROTHMAN JE, WIELAND FT. Protein sorting by transport vesicles. Science. 1996;272:227-34

SAWERS G, JARSCH M: Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in Escherichia coli. App I Microbiol Biotechnol, 1996, 46: 1-9

SHING, Y.; FOLKMAN, J.; SULLIVAN, R.; BUTTERFIELD, C.; MURRAY, J.; KLAGSBRUN, M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science, 223(4642):1296-9, 1984.

SIMONS M, HOROWITZ A. Syndecan-4-mediated signalling. Cell Signal. 2001;13:855-62.

SLEEMAN M, FRASER J, MCDONALD M, YUAN S, WHITE D, GRANDISON P, KUMBLE K, WATSON JD, MURISON JG. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. Gene. 2001 Jun 27;271(2):171-82.

SORENSEN V, NILSEN T, WIEDLOCHAA. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. Bioessays. 2006;28:504-14.

STUPACK, D.G., CHERESH, D.A. Get a ligand, get a life: integrins, signalins and cell survival. J. Cell Sciences 115:3729-38

SURANITI, E., TUMOLO, T., BAPTISTA M.S., LIVACHE, T., CALEM CZUK, R. Construction of Hybrid Bilayer Membrane (HBM) biochips and characterization of the cooperative binding between cytochrome-c and HBM Langmuir 2007 Jun 5;23(12):6835-42

TAMM, L.K.; MCCONNELL, H.M., Supported phospholipid bilayers *Biophysical Journal* Volume 47, Issue 1, January 1985, Pages 105-113

TAVERNA S, GHERSI G, GINESTRA A, RIGOGLIUSO S, PECORELLA S, ALAIMO G, SALADINO F, DOLO V, DELL'ERA P, PAVAN A, PIZZOLANTI G, MIGNATTI P, PRESTA M, VITTORELLI ML. Shedding of membrane vesicles mediates fibroblast growth factor-2 release from cells. *J Biol Chem.* 2003;278:51911-9.

TAVERNA S, RIGOGLIUSO S, SALAMONE M, VITTORELLI ML. Intracellular trafficking of endogenous fibroblast growth factor-2. *FEBS J.* 2008 Apr;275(7):1579-92. Epub 2008 Feb 25.

TERPE, K., Overview of tag fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems – *Appl. Microbiol Biotechnol* , 2003 60:523-533

TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S.; Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1528-34. Review.

UVERSKY, V. N. AND FINK, A. L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded, *Biochim. Biophys. Acta* , 2004, 1698, 131-153.

WONG, J.Y., J. MAJEWSKI, M. SEITZ, C.K. PARK, J.N. ISRAELACHVILI, SMITH, G.S. "Polymer-cushioned bilayers. 1. A structural study of various preparation methods using neutron reflectometry," *Biophys. J.*, Vol. 77, pg. 1445 (1999)

YAMAGUCHI TP, ROSSANT J. Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Aug;5(4):485-91. Review.

ZEHE C, ENGLING A, WEGEHINGEL S, SCHAFER T, NICKEL W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF- 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:15479-84.

ZHANG, X.; COUSENS, L.S.; BARR, P.J.; SPRANG, S.R. three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 beta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(8) 3446-50

ZHU, X.; KOMIYA, H.; CHIRINO, A.; FAHAM, S.; FOX, G.M.; ARAKAWA, T.; HSU, B.T.; REES, D.C. Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science*, 1991, 251 (4989), 90-93

SÚMULA CURRICULAR

Gilson Masahiro Murata

Nascido em 16 de agosto de 1979 em São José dos Campos - SP

e-mail gil_masa@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutoramento direto em Bioquímica, Biologia Celular e Molecular junto ao Grupo de Pesquisa de Fatores de Crescimento, Hormônios e Ciclo Celular. Instituto de Química (IQ) – USP.

Título do trabalho: FGF2 de 18kDa e 22,5kDa: sinalização molecular parácrina e funções biológicas

Orientador: Prof. Dr. Hugo A. Armelin.

Ingresso em 2004 e conclusão em 2010.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010

Graduação em Ciências Biológicas – IB USP

Ingresso em 2000 e conclusão em 2003

EEPSG Benedito Matarazzo - São José dos Campos – SP

Ensino Médio

Ingresso em 1994 e conclusão em 1996

EEPG Edewaldo Freitas Gaia Sant'Ana – São José dos Campos- SP

Ensino fundamental

Ingresso em 1985 e conclusão em 1993

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

MURATA, G. M. . Isolation and analysis of fibroblast growth factor-2 (FGF2) /Receptors (FGFRs) protein complexes in mouse cell lines. In: Cancer Today: From Molecular biology to treatment, 2005, São Paulo. Applied Cancer Research. São Paulo : Antonio Prudente Foundation A.C. Camargo Cancer Hospital Treatment and Research Center, 2005. v. 25. p. 45.

MURATA, G. M. . Isolation and analysis of fibroblast growth factor-2 (FGF2) /Receptors (FGFRs) protein complexes in mouse cell lines. XXXIV Reunião anual da SBBq. XXXIV Reunião anual da SBBq. 2005.

DERMARGOS, A., MURATA, G. M. and ARMELIN, H. A. HMW-FGF2 did not induced the senescence caused by LMW-FGF2 in ras-transformed cell. XXXVIII Reunião anual da SBBq. XXXIV Reunião anual da SBBq. 2009.