UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PEPTÍDEOS DE CONFORMAÇÃO RESTRITA RELACIONADOS AO SÍTIO 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS ÁCIDO HUMANO (hFGF-1): ESTUDO SOBRE ESTRUTURA E ATIVIDADE

SUMIKA KIYOTA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: Dra. MARIA TERÊSA M. MIRANDA

SÃO PAULO 2000

Ficha Catalográfica

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

Kiyota, Sumika

 K62p Peptídeos de conformação restrita relacionados ao sítio
 2 do fator de crescimento de fibroblastos ácido humano (hFGF-1) : estudo sobre estrutura e atividade / Sumika Kiyota. -- São Paulo, 2000.
 127p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Miranda, Maria Terêsa Macchini

1. Peptídeo : Bioquímica I. T. II. Miranda, Maria Terêsa Macchini, orientador.

574.192456 CDD

SUMIKA KIYOTA

PEPTÍDEOS DE CONFORMAÇÃO RESTRITA RELACIONADOS AO SÍTIO 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS ÁCIDO HUMANO (hFGF-1): ESTUDO SOBRE ESTRUTURA E ATIVIDADE

> Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

"Peptídeos de Conformação Restrita Relacionados ao Sítio 2 do Fibroblast Growth Factor-1: Estudo sobre Estrutura e Atividade".

SUMIKA KIYOTA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:				
Badmin				
Profa. Dra. MARIA TERESA MACHINI DE MIRANDA IQ - USP				
(Orientadora e Presidente)				
Slig-hth 1. g. Areis				
Profa. Dra. ELIZABETH PINHEIRO GOMES ARÊAS				
IQ - USP				
Laet				
Prof. Dr. LAERTE DE OLIVEIRA				
UNIFESP				
Profa. Dra. SIRLEI DAFFRE				
ICB – USP				
, Par ~				
Prof. Dr. PAULO LEE HO Instituto Butantã				
SÃO PAULO 29 DE FEVEREIRO DE 2000.				

À mínha querída famílía

que me tem dado todo o carinho, apoio e estímulo para fazer aquilo que quero.

AGRADECIMENTO A DEUS

Fostes Vós que me formastes as entranhas, e no seio de minha mãe Vós me tecestes. Eu vos louvo e vos dou graças, ó Senhor, porque de modo admirável me formastes! Que prodígio e maravilha as vossas obras! Até o mais íntimo, Senhor, me conheceis; uma sequer de minhas fibras ignoráveis, quando eu era modelado ocultamente, era formado nas entranhas subterrâneas. Ainda informe, os vossos olhos me olharam, e por Vós foram previstos os meus dias; em vosso livro estavam todos anotados, antes mesmo que um só deles existisse. (SI.138,13-16)

Agradecimentos

À **Dra. M. Terêşa M. Míranda**, por sua orientação no trabalho de Tese bem como pela formação científica, incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao **Dr. Angelo G. Gambaríní**, por sua colaboração e inestimáveis auxílios no aprendizado da caracterização biológica dos peptídeos e na análise dos resultados obtidos.

À **Dra. Wládía Vívíaní**, por sua colaboração e orientação segura e sempre atenciosa na etapa inicial do trabalho de Modelagem Molecular dos peptídeos.

Ao **Dr. Alberto Spísní** e toda a sua equipe: **Drs. Lorella Franzoní**, **Aríanna Bennedettí**, **Elena Ferreíra**, **Cesíra de Chíara e Gíuseppe Nícastro**; pela colaboração, auxílios técnicos nos experimentos de dicroísmo circular e de ressonância magnética nuclear e, acima de tudo, pela amizade, atenção e carinho que me dispensaram durante o meu estágio em seus laboratórios, na Itália.

Ao **Dr. Hugo Armelín**, por permitir que a maioria dos ensaios biológicos fossem realizados em seu laboratório e, em especial, à sua equipe: **Dra. Claudímara Loftí, Ana Paula, Telma, Cláudía, Ivan, Fábío, Éríco, Alexandre** e **Eduardo,** pela amizade, carinho e valiosos auxílios técnicos.

À **Dra. Zuleíde Alves Ramíro**, então Diretora-Geral e à **Dra. Vera Cecílía A. Ferreíra**, atual Diretora-Geral do Instituto Biológico de São Paulo, pelo apoio fundamental à conclusão deste trabalho.

Aos **Drs. Aluísio Alba** e **Márcio Hípólito,** pelo apoio, incentivo, compreensão e, atualmente, agradável convívio diário no Centro de Biotecnologia do Instituto Biológico.

Ao **Dr. Antonio Miranda**, pela execução da eletroforese em papel e espectrometria de massas de alguns dos peptídeos cíclicos.

Aos meus queridos amigos, colegas pós-graduandos e funcionários do Instituto de Química: Malu, Gíanní, Modesta, Mítsue, Sandra, Marcelo, Magalí, Cleber, Marcos, Daníela, Izaura, Neusínha, Francísco e Jaílton, pelos auxílios técnicos e convívio agradável que ajudaram a tornar o trabalho diário menos árduo.

À minha querida sobrinha **Rosa Kíyoka Naíto**, pelo seu carinho e sua paciente ajuda em informática durante a confecção da Tese.

Ao meu querido **paú**, e aos meus queridos **úrmãos** e, em especial, às minhas queridas irmãs **Irene, Helena** e **Luíza** que muito contribuíram para a minha formação pessoal e foram o meu porto-seguro de carinho, apoio, estímulo e ajuda nos momentos mais difíceis.

A **todos** aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças aos auxílios financeiros das seguintes Instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através da bolsa de Doutoramento concedida à autora durante a maior parte do Curso.

Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, através dos auxílios financeiros concedidos à autora na forma de passagens aéreas para a realização de um estágio na Itália (novembro/98) e apresentação de um poster em Minneapolis, Minnesota, USA (junho/99).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através da verba concedida ao projeto de pesquisa coordenado pela Dra. Miranda.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS	<i>iii</i>
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ESQUEMAS	x
LISTA DE ABREVIAÇÕES	xi
RESUMO	<i>xiii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PEPTÍDEOS BIOLO GICAMENTE ATIVOS	1
1.2. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS	2
1.3. PEPTÍDEOS DE CONFORMAÇÃO RESTRITA	4
1.4. USO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO ESTUDO DE POLIPEPTÍDEOS	5
1.5. OS FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS (FGFS) E SEUS SÍTIOS DE INTERAÇÃO	7
1.6. OS RECEPTORES DOS FGFS, O HEPARAM SULFATO E A HEPARINA	9
1.7. DADOS ESTRUTURAIS DOS COMPONENTES DO COMPLEXO FORMADO POR FGF- FGFR-HEP E MODELOS DE INTERAÇÃO	12
1.8. ANÁLISE CONFORMACIONAL DE PEPTÍDEOS	12
2. PROPOSIÇÃO	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. DESENHO DE PEPTÍDEOS	22
3.2. MODELAGEM MOLECULAR	22
3.3. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA	24
3.4. CICLIZAÇÃO	25
3.4.1. Oxidação de grupos sulfidrilas pelo oxigênio do ar (Esquema 4)	25
3.4.2. Oxidação de grupos sulfidrilas com Ferricianeto de Potássio 0,01 M (Esquema 4)	
3.4.3. Ciclização via lactama (Esquema 4)	26
3.5. ANALISE E FURIFICAÇÃO.	20
3.0. CARACTERIZAÇÃO QUIMICA	
3.6.2 Hidrólica tatal a anólica da aminaóaidas	
3.6.3. Espectrometria de massa	
3.7. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA	
3.7.1. Atividade mitogênica	30
3.7.2. Marcação dos hFGF-1 e hFGF-2 com ¹²⁵ L	32
3.7.3. Ensaio de ligação entre o peptídeo e o receptor celular 3.7.4. Incorporação de bromo deoxiuridina (BrdU) em células tratadas com peptídeos	
sintéticos	
3.7.5. Ensalo de ligação do peptideo sintético à heparina: Cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose CL-6B	34

3.8. ANÁLISE ESTRUTURAL DE PEPTÍDEOS EM SOLUÇÃO ATRAVÉS DE MÉTODOS	
ESPECTROSCOPICOS	35
3.8.1. Espectroscopia de fluorescência	35
3.8.2. Dicroísmo circular	35
3.8.3. Ressonância magnética nuclear protônica ('H-RMN)	35
Determinação das estruturas de III, IV e XVIII	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. ESTUDO CONFORMACIONAL DO PEPTÍDEO A c-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH2 (I)	
4.1.1. Análise conformacional teórica	38
4.1.2. Análise conformacional em solução	
4.2. DESENHO E MODELAGEM MOLECULAR	43
4.2.1. Peptídeos derivados da região 2 do hFGF-1	43
4.2.2. Peptídeos derivados do DIII do receptor FGFR-1	52
4.3. SÍNTESE, CICLIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE	53
PEPTIDEUS.	
4.5.1. Resultados e Discussao	
4.5.2. Comentarios importantes	
4.4. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	79
4.4.1. Atividade mitogênica dos peptídeos sintéticos	79
4.4.2. Ensaios de incorporação de BrDU com os peptídeos I e IV	87
4.4.3. Ensaios de inibição da ligação do ¹²³ I-HFGF-1 aos seus receptores celulares em	
presença dos peptídeos sintéticos	
4.4.4. Ensaio de ligação dos peptídeos I, III, IV, X, XI e XIV a coluna de HEP-Sepharose	89
4.5. ESTUDO CONFORMACIONAL DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS EM SOLUÇÃO	90
4.5.1. Peptídeos Ac-SKKHAEKNWF-NH2 (III) e c(1-5) Ac-CKKHCEKNWF-NH2 (IV)	90
4.5.2. Peptídeo Ac-NTTDKENEVLH-NH ₂ (XVIII) derivado do FGFR-1 b (domínio DIII-	103
<i>100p</i> DE)	102
5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	104
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ABSTRACT	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peptídeos relacionados ao Sítio 2 do hFGF-1 estudados neste trabalho	xiii
Tabela 2: Condições escolhidas para as simulações por Dinâmica Molecular em alta temperatura	23
Tabela 3. Condições escolhidas para o "annealing" as amostras de conformações coletadas	23
Tabela 4. Condições escolhidas para a minimização final das conformações	23
Tabela 5: Distâncias entre os C a dos resíduos de aminoácidos do loop 121-138 do FGF-1 humano	45
Tabela 6: Valores de RMS e de energia correspondentes às conformações teóricas adotadas pelo peptídeo Ac-HAEKNWF-NH ₂	45
Tabela 7: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(4-6)[Ac-WFVCLPCKRGPRT-NH ₂]	48
Tabela 8: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(4-13)[Ac-WFVCLPSKRGPRC-NH2]	49
Tabela 9: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(3-7)[Ac-WFCGLPCKR-NH2]	49
Tabela 10: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(1-13)[Ac-WFCGLPSKRGPRC-NH2]	50
Tabela 11: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(4-7)[Ac-WFVCLPCKR-NH ₂]	50
Tabela 12: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo Ac-WFVGLPSKR-NH2	51
Tabela 13: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH ₂	51
Tabela 14: Síntese, purificação e caracterização química dos peptídeos estudados	53
Tabela 15: Condições experimentais de RP-HPLC analítica dos peptídeos purificados	54
Tabela 16: Composição de aminoácidos nos peptídeos V e IV	
Tabela 17: Resumo dos resultados dos ensaios de atividade mitogênica (A) e da medida das capacidades de ligação à resina de HEP-Sepharose (B) e de inibição da ligação de ¹²⁵ I–hFGF-1 e ¹²⁵ I–hFGF-2 aos receptores celulares (C)	80
Tabela 18: Incorporação de BrdU no DNA de fibroblastos A-31 estimulados com os peptídeos III e VI: Imunofluorescência indireta	87
Tabela 19: Deslocamentos químicos (dem ppm) ^a dos prótons NH e CH contidos no peptídeo Ac-SKKHAEKNWF-NH ₂ (III) determinados nos espectros de ¹ H- RMN	94
Tabela 20: Deslocamentos químicos (dem ppm) ^a dos prótons NH e CH contidos no peptídeo c(1-5) Ac-CKKHCEKNWF-NH ₂ (IV) determinados nos espectros de ¹ H-RMN	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Etapas da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia t-Boc (Stewart & Young, 1984)	3
Figura 2:	Tipos de ciclização de peptídeos segundo Toniolo, 1990	5
Figura 3.	Alinhamento das seqüências primárias dos FGFs-1 e -2 humanos (Venkataraman et al., 1999). • - resíduos sugeridos por Springer e colaboradores (1994) como constituindo o Sítio 1 de ligação ao receptor; • - resíduos sugeridos como constiuindo o sítio de ligação à heparina; resíduos sublinhados- região que contém o Sítio 2 de ligação ao receptor	8
Figura 4:	Estrutura tridimensional do FGF-1 humano (Zhu et al., 1991; Blaber et al.,1996)	9
Figura 5:	Seqüências primárias dos domínios DII e DIII do FGFR 1 b (Zhang et al., 1999)	10
Figura 6:	Dissacarídeo que se constitui na unidade estrutural repetitiva da molécula de heparina (Fahan et al., 1996)	11
Figura 7:	Seqüência primária da região 2 do FGF-1 segundo Jaye et al., 1986	37
Figura 8:	Estruturas representantes das familias de conformações teóricas assumidas pelo peptídeo Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH ₂ e obtidas em simulações de Dinâmica Molecular a 800K por 100 ps seguidas de resfriamento e	20
		38
Figura 9:	Região 6-9 ppm do espectro unidimensional (1D-H-RMN) do peptídeo I. Condições experimentais:~4 mM de peptídeo em 10%D ₂ O/H ₂ O contendo 150 mM de KCl, pH 5,2, 300MHz	40
Figura 10	:Região 3,7-4,6 ppm do espectro bidimensional (2D ¹ H-RMN- DQCOSY) do peptídeo I. Condições experimentais: ~4 mM do peptídeo em 10% D ₂ O/H ₂ O contendo 150 mM de KCl, pH 5,2; 500MHz	40
Figura 11	:Região 3,7-4,8 ppm do espectro bidimensional (2D ¹ H-RMN -DQCOSY) do peptídeo I expandida. Condições experimentais: ~4 mM do peptídeo em 10% D ₂ O/H ₂ O contendo 150 mM de KCl, pH 5,2; 500MHz	41
Figura 12	:Espectro bidimensional expandido de DQCOSY peptídeo I. Condições experimentais:~4 mM do peptídeo em 10% D ₂ O/H ₂ O contendo 150 mM de KCl, pH 5,2; 500MHz (2D ¹ H-RMN -DQCOSY)	41
Figura 13	: Análise dos resultados mostrados nas Figuras 9-12. A = Tabela dos valores de deslocamentos químicos (ppm) dos prótons NH e CH de cada um dos resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo I obtidos dos espectros 2D- ¹ H-RMN, em comparação com os deslocamentos químicos encontrados para prótons CH presentes nos aminoácidos de proteínas em conformação aleatória (rc = random coil). B = Gráfico da diferença de deslocamento químico entre CH e CHrc de cada um dos resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo I. C = Gráfico dos índices de deslocamento químico calculados a partir da tabela de Wishart (1992).	42
Figura 14	: Alça que corresponde ao loop 3 na estrutura do FGF-1 proposta por Murzin et al. 1992	43
Figura 15	:Conformações teóricas do peptídeo Ac-HAEKNWF-NH ₂	46

Figura 16: Comparação entre as conformações teóricas do peptídeo Ac-SKKHAEKNWF-NH ₂ 46
Figura 17: Conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWNH ₂]47
Figura 18: Conformação teórica média do peptídeo Ac-SKKHA-NH ₂ (VI)
Figura 19: Comparação entre as conformações teóricas do peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHC-NH ₂ (VII)]48
 Figura 20: Perfis de RP-HPLC dos peptídeos I e X. A = material bruto; B = peptídeo I purificado; C = peptídeo IV purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; solvente A: H₂0/0,1% TFA; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradiente linear: 40-60% de B em 20 min (1% B/min); fluxo: 1ml/min; 1: 210 nm. {Abs] = Absorbância
 Figura 21: Perfis de RP-HPLC dos peptídeos I e X.A = material bruto; B = peptídeo I purificado; C = peptídeo X purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; solvente A: H₂0/0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min para A, 40-60% de B em 20 min para B e C; fluxo: 1ml/min. (Abs = absorbância)
 Figura 22: Perfis de RP-HPLC do peptídeo II. A = material bruto; B = peptídeo purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; solvente A: H₂0/0,1% TFA; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min para A, 30-60% de B em 30 min para B; fluxo: 1ml/min. (Abs = absorbância)
 Figura 23: Perfis de RP-HPLC do peptídeo III purificado. A = em TFA; B = em TEAP. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; fluxo: 1ml/min; 1: 210 nm; solvente A: TEAP e solvente B: 60% ACN/TEAP e gradiente linear: 20-40% de B em 20 min (A); solvente A: H₂0/0,1% TFA EM H₂O; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA e gradiente linear: 25-45% de B em 20 min (B)
 Figura 24: Perfis de RP-HPLC do peptídeo IV bruto no início (A) e final da ciclização por de O₂ do ar (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-4; solvente A: 0,1% TFA; solvente B: 40% ACN/0,09% TFA em H₂O; fluxo: 1ml/min; l: 220 nm; gradiente linear: 5-95% de B em 30 min.(Abs = absorbância)
 Figura 25: Perfis de RP-HPLC do peptídeo IV no início da ciclização (A), após 2 h de oxidação por K₃Fe(CN)₆ (B), após purificação (C). Condições experimentais: coluna: Vydac C-4; solvente A: 0,1% TFA; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; fluxo: 1ml/min; 1: 220 nm; gradiente 5-95% de B em 30 min (solução de ciclização), 25-45% de B em 30 min (purificado). (Abs = absorbância)
Figura 26: Perfis de RP-HPLC dos peptídeos IV e V. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: TEAP, solvente B: 60% ACN/TEAP; gradiente: 20% a 40% de B em 20 min. A = peptídeo purificado em sistema TFA; B = peptídeo V repurificado segundo o Esquema 5 (sistema TEAP); C = peptídeo IV repurificado segundo o mesmo esquema. (Abs = absorbância)
 Figura 27: Análise comparativa por RP-HPLC do peptídeo IV repurificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; Peptídeo IV purificado: A) solvente A: 0,1% TFA, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradiente: 30% a 50% de B em 20 min. B) solvente A: TEAP, solvente B: 60% ACN/TEAP; gradiente: 25% a 45% de B em 20 min (Abs = absorbância)

Figura 28:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo VII. A = bruto no início da ciclização; B = no final da ciclização em presença de K ₃ Fe(CN) ₆ 0,01 M; C = peptídeo purificado.Condições experimentais: coluna: C-4 Vydac, fluxo: 1ml/min; 1 : 220 nm; solvente A: 0,01% TFA, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradiente: 5 - 95% de B em 30 min (A, B) e 30 - 60% de B em 30 min (C). (Abs = absorbância)
Figura 29:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo VIII bruto obtido após ciclização a 37°C (A) e após ciclização a 60°C (B).Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradiente: 5-95% de B em 30 min
Figura 30:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo IX bruto ciclizado (A) e purificado (B). (C) refere -se ao contaminante de $t_R = 15,34$ min purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; fluxo: 1ml/min; solvente A: TEAP; solvente B: 60% ACN/TEAP; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A); 15-35% de B em 20 min (B); 15-35% de B em 20 min (C)
Figura 31:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XI bruto ciclizado (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: C-18 Vydac; fluxo: 1ml/min solvente A: TEAP, solvente B: 60% ACN/TEAP; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A); 45-65% de B em 30 min (B). (Abs = absorbância)
Figura 32:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XII bruto ciclizado (A) e após purificação (B). Condições experimentais: coluna: C-18 Vydac; fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 90% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A); 50-70% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)
Figura 33:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XIII bruto antes (A), após a ciclização (B) e purificado (C). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/ H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min. Para (C) foi utilizado o sistema TEAP: solvente A: TEAP; solvente B: 60% ACN/TEAP; gradiente linear: 25- 65% de B em 30 min (C). (Abs = absorbância)
Figura 34:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XIV bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 90% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5- 95% de B em 30 min (A), 40-60% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)
Figura 35:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XIV bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5- 95% de B em 30 min (A), 45-65% de B em 30 min (B). (Abs = absorbância)
Figura 36:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XV bruto (A), sobrenadante da solução ciclização (B) E do peptídeo XV purificado (C). Condições experimentais: coluna: C-18 Vydac, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradiente: 5-95% de B em 30 min (A e B). O gradiente usado para (C) foi: 40 - 60% de B em 30 min. (Abs = absorbância)
Figura 37:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XVI bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5- 95% de B em 30 min (A), 40-60% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)

Figura 38:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XVII bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5- 95% de B em 30 min (A), 40 - 60% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)74
Figura 39:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XVIII bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5- 95% de B em 30 min (A), 20-40% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)
Figura 40:	Perfis de RP-HPLC do peptídeo XIX bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H ₂ O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H ₂ O; gradientes lineares: 5- 95% de B em 30 min (A), 20-40% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)
Figura 41:	Curva dose versus resposta da atividade mitogênica dos peptídeos I e X s obre fibroblas tos Balb/C 3T3, clone A31. Os valores são expressos em % R e correspondem à atividade mitogênica dos peptídeos em relação àquela observada com FCS 10% (100 de %R). O FGF1 usado como controle apresentou uma atividade de 10,3 de % R na concentração utilizada (10 ng/mL)
Figura 42:	Curva dose versus resposta da atividade mitogênica dos peptídeos I e X sôbre fibroblastos Balb/C 3T3, clone A31, na presença de 10 mg/mL de heparina. Os valores são expressos em % R e correspondem à atividade mitogênica dos peptídeos em relação àquela observada com FCS 10% (100 de %R). O FGF1 usado como controle apresentou uma atividade de 10,3 de % R na concentração utilizada (10 ng/mL)
Figura 43.	Curvas dose versus resposta da atividade mitogênica dos peptídeos I, III, IV, X, XI e XIV sôbre fibroblastos Balb/C, clone A-31. Os valores são expressos em %R e correspondem à atividade mitogênica dos peptídeos em relação àquela observada com FCS 10% (100% R)
Figura 44.	Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos I e IV separadamente e com a mistura de ambos em concentrações iguais
Figura 45.	Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina triciada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeo IV e seu contaminante V, adicionados separada ou simultaneamente na proporção de 1:1 à cultura de células. FGF-1 (1,0 ng/mL, 7251cpm) e PBS (2229 cpm)
Figura 46.	Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos XII, XIII e XI. FGF-1 (1,0 ng/mL-9389 cpm). PBS - (1990 cpm)
Figura 47.	Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos XV e XIV. FGF-1 (1,0 ng/mL-7251 cpm) . PBS (2229 cpm)

Figura 48.	. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos XVI e XVII. FGF-1 (1,0 ng/mL- 7251 cpm).	
	PBS (2229 cpm)	86
Figura 49.	. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações do peptídeo XVIII pré-incubado) com FGF-1 (2 ng/mL-34820 cpm) ou com FGF-2 (2 ng/mL-48241 cpm)	87
Figura 50.	. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações do peptídeo XIX pré-incubado com FGF-1 (2 ng/mL-22012 cpm) ou com FGF-2 (2 ng/mL- 20187 cpm).	87
Figura 51:	: Espectros de CD de III (A) e IV (B) a 0,01M en solução de tampão fosfato 5mM a 20°C em função do pH	91
Figura 52:	: Espectros de CD de III (A) e IV (B) a 0,01M em solução de tampão fosfato 5mM, pH 6,0 a 20°C em função da variação da porcentagem de MeOH (%v/v)	92
Figura 53:	: Estruturas tridimensionais dos peptídeos III (A) e IV (B) derivadas dos dados obtidos por 2D- ¹ H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/CD ₃ OH (1:1, v/v) a 25°C. A superposição das estruturas foi feita nos trechos: K2-H4 com RMSD de 0,91±0,25 Å para o peptídeo linear III; e K2-E6 com RMSD de 0,53 ±0,15 Å para o peptídeo cíclico IV. No caso do cíclico a ponte dissulfeto entre C1-C5 está mostrada em apenas uma das estruturas (em amarelo)	95
Figura 54:	:Estruturas tridimensionais do peptídeo IV derivadas dos dados obtidos por 2D- ¹ H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/CD ₃ OH (1:1, v/v) a 25°C. A superposição dos átomos do esqueleto perptídico foi feita nos seguintes domínios: C5-F10 com RMSD 0,33±0,12 Å (A); K2-F10 com RMSD 0,77±0,25 Å (B). Em B, a fita foi desenhada para melhor representar a conformação do esqueleto peptídico. A ponte dissulfeto entre C1-C5 está mostrada em apenas uma das estruturas (em amarelo)	96
Figura 55:	: Espectros de CD dos peptídeos III (A) e IV (B) em função da variação da porcentagem de TFE.Condições experiementais: 0,01M de peptídeo emsolução de tampão fosfato 5mM, pH 6,0 a 20°C	97
Figura 56:	: Estruturas tridimensionais do peptídeo IV derivadas dos dados obtidos por 2D- ¹ H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/TFE-d ₃ (1:1 v/v) a 25°C. A superposição dos átomos do esqueleto perptídico foi feita nos seguintes domínios: K2-E6 com RMSD 0,91±0,29 Å (A); E6-F10 com RMSD 0,50±0,21Å (B). Em B, a fita foi desenhada para melhor representar a conformação do esqueleto peptídico. A ponte dissulfeto entre C1-C5 está mostrada em apenas uma das estruturas (em amarelo)	99
Figura 57:	: Superposição de uma estrutura tridimensional representativa do peptídeo IV (em vermelho) derivada dos dados obtidos por 2D- ¹ H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/CD ₃ OH (1:1, v/v) a 25°C com o fragmento correspondente da estrutura do cristal do FGF-1 (em azul). A superposição dos átomos do esqueleto perptídico foi feita nos seguintes trechos: C1-H4 com RMSD 0,65 Å (A); H4-E6 com RMSD 0,09Å (B); C1-N8 com RMSD 2,2 Å. Na mis tura tampão fosfato/TFE-d ₃ , foram obtidos resultados de RMSD semelhantes para os mesmos trechos 0,51 Å (A) e 0,11 Å (B), não tendo sido possível superpor as	

estruturas do peptídeo com a seqüência do FGF-1 correpondente por uma extensão maior do que esses mostrados	100
Figura 58: Espectros de CD de III (A) e IV (B) em função da variação da porcentagem de SDS.Condições experimentais: 0,01M de peptídeo em solução de tampão fosfato 5 mM, pH 6,0 a 20°C	101
Figura 59: Espectros de CD do peptídeo XVIII em função da adição de quantidades crescentes de TFE (%, v/v). Condições experimentais: 0,01M em solução tampão fosfato 5mM, pH 6,0 a 20°C	103
Figura 60: Estruturas tridimensionais selecionadas do peptídeo XVIII derivadas dos dados obtidos por ¹ H-RMN e após uma superposição dos átomos do esqueleto peptídico do trecho Asp4-Leu10. Condições experimentais: TFE/d ₃ /tampão fosfato pH 6,0 (70:30, v/v) a 25°C	103

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1:	Esquema geral do trabalho realizado com os peptídeos derivados do hFGF-1	20
ESQUEMA 2:	Esquema geral do trabalho realizado com os peptídeos derivados do FGFR-1 b	21
ESQUEMA 3:	Procedimento Experimental para a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida	25
ESQUEMA 4:	Representação esquemática das ciclizações dos peptídeos via ligação dissulfeto e via ligação lactama	27
ESQUEMA 5:	Seqüência de passos para a purificação/separação de peptídeos e contaminantes por RP-HPLC.	29
ESQUEMA 6:	Protocolo de determinação da atividade mitogênica dos peptídeos em cultura de células	31
ESQUEMA 7:	Protocolo experimental da ciclização do peptídeo IV	59
ESQUEMA 8:	Esquema da ciclização do peptídeo VIII	64
ESQUEMA 9:	Representação esquemática da ciclização do peptídeo IX	66
ESQUEMA 1(): Protocolo experimental para a ciclização dos peptídeos XII, XIII e XV	69

LISTA DE ABREVIAÇÕES

As abreviações utilizadas estão de acordo com as recomendações da *IUPAC-IUB Comission on Biochemical Nomenclature* (J. Biol.Chem. 264, 668-673, 1989).

A ou Ala – alanina ACN - acetonitrila BrDU - 5-bromo 2'-deoxiuridina BSA - albumina sérica bovina (bovine serum albumin) -Bzl - éter benzílico -BzI-OMe - p-metoxibenzil- . C ou Cys – cisteína CD - Circular Dicroism CI-Z - 2-cloro-benziloxicarbonil COSY - Correlated Spectroscopy D ou Asp - ácido aspártico DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol Dbu - ácido diaminobutírico DCM - diclorometano DIC- diisopropilcabodiimida **DIPEA - N, N-diisopropiletilamina** DMEM - meio mínimo de Eagle modificado por Dubelco (Dubelco's Minimum Eagle's Medium) DMF-N.N-dimetilformamida DMS - dimetilssulfeto DQF-COSY - double quantum filter correlated spectroscopy DTT - ditiotreitol E ou Glu - ácido glutâmico ESI - Eletron Spray Ionization F ou Phe – fenilalanina FCS - soro bovino fetal (fetal calf serum) FGF-1 – fator de crescimento de fibroblastos ácido FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos básico FITC - isotiocianato de fluoresceína Fmoc – 9-fluorenilmetoxicarbonil G ou Gly – glicina H ou His – histidina HEP - heparina HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico HF- fluoreto de hidrogênio HOBt- 1-hidroxibenzotriazol HS – sulfato de heparam

HTMD – high temperature molecular dynamic

I ou lle - isoleucina IgG - imunoglobulina G K ou Lys - lisina L ou Leu – leucina M ou Met -metionina MALDITOF - Matrix Assisted Light Desorption Ionization - Time of Flight MBHA - metilbenzidrilamina MeOH - Metanol MS - Mass Spectrometer N ou Asn – asparagina NMP - 4-N-metil-pirrolidona NOE – nuclear Overhauser effect NOESY – 2 dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy -Obzl - éster benzílico OFmoc – éster de 9-fluorenilmetoxicarbonila P ou Pro – prolina PBS – solução salina tamponada por fosfato (phosphate buffer saline) Q ou Gln – glutamina R ou Arg – arginina RMN - ressonância magnética nuclear RMSD – root mean square deviation ROE - rotating frame NOE ROESY – 2 dimensional rotating-frame NOE spectroscopy RP-HPLC - reversed phase-high performance liquid chromatography S ou Ser – serina SDS – dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate) SPPS – solid phase peptide synthesis T ou Thr – treonina tBoc - tert butiloxicarbonila TBTU – tetrafluorborato de 2(1-H-benzotriazol-1il)-1,1´,3,3´- tetrametiluronio TEA - trietilamina TEAP- fosfato de trietilamina TFA - ácido trifluoroacético TFE - 2, 2, 2-trifluoroetanol Timidina - (1-[2-deoxi β D-ribofuranosil] 5-metiluracila) Timidina triciada - metil-³H-timidina TOCSY- total correlation spectroscopy -Tos - tosil -V ou Val – valina W ou Trp - triptofano

RESUMO

Na busca por agonistas, antagonistas e inibidores de natureza peptídica do fator de crescimento de fibroblastos ácido humano (hFGF-1), iniciamos o presente trabalho fazendo uma análise conformacional teórica do peptídeo Ac- WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ (107-123 [hFGF-1]). Em trabalho anterior, este composto havia se mostrado um agonista da atividade mitogênica da proteína capaz de inibir a ligação de ¹²⁵I-hFGF-1 aos seus receptores celulares e de se ligar à resina heparina-Sepharose (Oyama et al. 1996). Os cálculos das propriedades dinâmicas deste peptídeo (**I; Tabela 1**) demonstraram que ele não adotava nenhuma conformação preferencial, o que poderia justificar a baixa atividade apresentada pelo mesmo (10⁴ vêzes menor do que a da proteína nativa). Este peptídeo foi ressintetizado, purificado, caracterizado química e biologicamente, confirmando os resultados anteriores. Seu comportamento randômico foi comprovado experimentalmente através de uma análise estrutural parcial por ¹H-RMN. O resultado desta análise demonstrou que este peptídeo exibe uma configuração *random coil*, em solução aquosa (Kiyota et al., 1996, 1999).

Diante desta constatação e com base em dados descritos na literatura (Harper & Lobb 1988; Burgess et al., 1991; Pantoliano et al., 1994, Springer et al., 1994; Thompson et al., 1994; Imamura et al., 1995; Blaber et al., 1996; Ornitz et al., 1996; Zhu et al., 1991, 1995, 1997; Schwizer, 1995; Sieber & Moe, 1996; Rizo et al., 1996); desenhamos dezessete peptídeos relacionados ao Sítio 2 (97-132) do hFGF-1 mostrados na **Tabela 1** abaixo:

	97	110	120	132
Sítio 2 hFGF-1	YISKKHAEKN	WFVGLKK	NGSCKRGPRT	HYGOKAILF
1 I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	Ac	- WFVGLKK	N G S S K R G P R T	-NH ₂
II.	<mark>Ас-</mark> Н А Е К М	NWF-NH2		
III	Ac-S K K H A E K N	NWF-NH2		
IV	c(1-5) [Ac-C K K H C E K N	NWF-NH2		
V	c(1-5)[Ac-C K K H C E K -	W F -NH ₂		
VI	Ac-S K K H A -NH ₂			
VII	c(1-5)[Ac-C K K H C-NH ₂]			
VIII	c(5-14)[Ac-S K K H E E K N	NWFVGLKK-	NH ₂]	
IX	c(1-5)[Ac-D K K H X E K N	NWF- <mark>NH</mark> 2		
X	Ac	- WFVGLK -	NGSSKRGPRT	-NH ₂
XI	Ac	- W F V G L 1	P SKR-NH ₂	
XII	c(4-7)[Ac	- WFVCL]	$P C K R - NH_2$	
XIII	c(3-7)[Ac	- W F C G L 1	$P C K R - NH_2$	
XIV	Ac	- W F V G L	P SKRGPRT	-NH ₂
XV	c(3-13)[Ac	- W F C G L 1	P SKRGPRC	-NH ₂]
XVI	Ac	- W F V G L K A	N G S S K R G P R T	-NH ₂
XVII	Ac	- WFVGLAK	NGSSKRGPRT	-NH ₂

Tabela 1: Peptídeos relacionados ao Sítio 2 do hFGF-1 estudados neste trabalho

(X) = Dbu; (–) = deleção de aminoácidos; (c) = ciclo; numeração da seqüência segundo Jaye et al., 1986

Todos os peptídeos foram sintetizados manualmente por síntese em fase sólida, sempre que possível purificados à homogeneidade por RP-HPLC e caracterizados quimicamente por RP-HPLC, análise de aminoácidos e espectrometria de massas. Os peptídeos cíclicos foram obtidos por: a) oxidação das sulfidrilas das cisteínas e formação de ponte dissulfeto intramolecular; b) reação entre os grupos amina e carboxila de cadeias laterais de dois diferentes resíduos de aminoácidos com formação de uma ligação lactama.

Os testes de atividade mitogênica foram realizados sempre que os peptídeos eram obtidos com pureza \geq 90% determinada por RP-HPLC analítica em dois sistemas diferentes de solventes. Os resultados obtidos em culturas de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3 mostraram que: 1) II, III, VI-IX e XIII eram inativos; 2) o cíclico IV era mitogênico (ED₅₀ ~50 µM) ao contrário do seu análogo linear correspondente (III); 3) V, um análogo de IV que apresenta deleção de um resíduo (Asn), exibia uma atividade mitogênica menor do que a de IV; 4) X exibia uma atividade mitogênica menor do que a do I; 5) os cíclicos XII e XV exibiam atividades

comparáveis a do I, enquanto que os seus análogos lineares correspondentes (XI e XIV) eram inativos; 6) XVI e XVII exibiam atividades mitogênicas também comparáveis à de I.

Paralelamente a estes estudos, foi desenvolvido um modelo teórico dos domínios extracelulares DII e DIII do FGFR-1β. A partir do posicionamento gráfico das moléculas de hFGF-1 e de um hexassacarídeo de heparina junto a este modelo do receptor, foram desenhados os peptídeos *Ac-¹⁷⁰NTTDKENEVLH*¹⁸⁰-*NH*₂ (**XVIII**) e *Ac-¹⁹⁴SLAGNSIGLSH*²⁰⁴-*NH*₂ (**XIX**) (Oyama et al., 1997). Estes dois peptídeos cujas seqüências primárias são, respectivamente, relacionadas àquelas dos loops DE e FG do domínio DIII, foram também sintetizados e testados neste trabalho como possíveis ligantes do sítio 2 do hFGF-1.Os testes biológicos demonstraram que o peptídeo **XIX**, na faixa de concentração testada, não exibia nenhuma atividade inibitória sobre as atividades mitogênicas dos FGFs -1 e -2. Por outro lado, notou-se um claro efeito inibitório de **XVIII** sobre a atividade mitogênica de ambas as proteínas, sendo este efeito mais significativo para o FGF-2 (Kiyota et al., 1998).

Alguns dos peptídeos estudados foram submetidos a análises espectroscópicas com o objetivo de determinar suas conformações em solução. Este conhecimento forneceria subsídios para o desenho de novos peptídeos mitogênicos e, mais ainda, para determinação dos requisitos estruturais destes peptídeos e, como reflexo, do hFGF1 para expressão de suas atividades mitogênicas.

Assim, foi feita uma análise parcial do peptídeo mitogênico **IV** e de seu análogo linear **III** inativo em solução aquosa empregando fluorescência e ¹H–RMN ((Kiyota et al., 1998). Estes peptídeos foram analisados também por técnicas de CD e ¹H-NMR (Kiyota et al., 1999). Os resultados obtidos mostraram que **III** e **IV** parece se organizarem de forma semelhante em suas porções N-terminais, em estruturas correspondentes a *b-turns*. Por outro lado, as conformações das porções C-terminais destes peptídeos diferiram; somente em **IV**, observouse a presença de uma família de confôrmeros com estruturas helicoidais nessa porção do esqueleto e que eram superponíveis. O mesmo não foi observado na porção C-terminal de **III**.

A análise conformacional do peptídeo **XVIII** em solução foi também realizada empregando-se CD e ¹H-RMN. Os resultados obtidos indicaram que este peptídeo tem forte tendência em assumir uma estrutura helicoidal em solução aquosa contendo 50% CD₃OH.

O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que: 1) a presença de W¹⁰⁷ e F¹⁰⁸ é, de fato, essencial para a expressão da atividade mitogênica de peptídeos derivados do sítio 2 do hFGF-1; 2) a presença de N¹⁰⁶ adjacente ao *core* hidrofóbico constituído pelos resíduos W¹⁰⁷F¹⁰⁸ é importante; 3) a ciclização do peptídeo **IV** foi decisiva para a expressão de sua atividade, indicando que, não apenas a presença, mas o posicionamento adequado das cadeias laterais de N¹⁰⁶, W¹⁰⁷ e F¹⁰⁸ são determinantes; 4) apenas uma das lisinas (K¹¹² ou K¹¹³) é essencial para a atividade mitogênica (**X**, **XVI** e **XVII**); 5) o importante parece ser a manutenção do posicionamento das cadeias laterais em relação aos dos outros resíduos contidos na seqüência, uma vez que, a substituição do segmento ¹¹²KKNGS¹¹⁶ por uma prolina e/ou deleção de ¹²⁰GPRT¹²³ (**XI** e **XIV**) abolem a atividade mitogênica do peptídeo; 6) a ciclização que mantem a distância e as orientações relativas entre WF e KR (considerados essenciais para a atividade) em seqüência (**XII** e **XV**), leva à recuperação da atividade; 7) a atividade inibitória específica para o FGF-2 exibida pelo peptídeo **XVIII** parece ser um indicativo de que a alça DE do domínio DIII do receptor pode estar envolvido na ligação a esta proteína.

Estas conclusões são relevantes e essenciais para: 1) o entendimento dos requisitos estruturais para a atividade mitogênica dos peptídeos estudados e, como reflexo, do hFGF-1, 2) o desenho de novos agonistas, antagonistas ou inibidores do sistema FGF.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PEPTÍDEOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS

Os peptídeos constitutem uma classe de compostos químicos que exercem uma grande variedade de funções biológicas importantes nos organismos.

A existência destes compostos como móleculas íntegras ativas e não apenas como produtos de degradação de proteínas, foi evidenciada após vários terem sido isolados de fontes naturais diversas. Dentre os peptídeos biologicamente ativos pode-se citar as encefalinas (Lord et al., 1977), a angiotensina (Cushman & Cheung, 1971), a bradicinina (Rocha e Silva, 1963), a ocitocina (Nestor et al., 1975), a vasopressina (Dyckes et al., 1974), a somatostatina (Verber et al., 1981), o glucagon (Rivier et al., 1978), as colecistocininas (Liddle et al., 1986), α -melanotropina (Sawyer et al., 1982), as conotoxinas de veneno de *Conus geografus* (Rivier et al., 1987, Oliveira et al., 1990), as fitoquelatinas (Rauser, 1995) e as equinocandinas (Kurokawa & Ohfune, 1993).

Com a descoberta de que estes compostos poderiam ser sintetizados, tornou-se possível a obtenção dos mesmos em quantidades suficientes para o estudo de suas propriedades biológicas, dos mecanismos de ação (Wrigthon et al., 1996, Leconte et al., 1998) e para o desenvolvimento de diversos agentes terapêuticos. Muitos deles já estão disponíveis no mercado farmacêutico e o desenho de novos outros continua (Ghiara et al., 1997).

Alguns peptídeos nativos assumem suas conformações ativas à medida que vão sendo biossintetizados e liberados dos ribossomos ou mesmo, em alguns casos, com o auxílio de chaperonas (Ellis, 1994), que são descritas como moléculas auxiliares no enovelamento de proteínas nativas. Entretanto, a maioria dos peptídeos biologicamente ativos apresentam grande flexibilidade conformacional e assumem suas conformações biologicamente ativas somente quando em presença de seus receptores (*induced fit*; Schwizer, 1995; Hohr & Rogers, 1995). Estes peptídeos, portanto, não mantém suas estruturas funcionais quando na forma cristalina ou em soluções aquosas (Taylor & Ösapay, 1990).

Analogamente às proteínas, os peptídeos exercem suas atividades através da interação de determinados grupos funcionais de aminoácidos presentes em suas estruturas com os seus receptores celulares (Jones & Thornton,1996). A afinidade de ligação nestas interações é determinada pela complementaridade química e espacial entre os epitopos do ligante e o receptor (Schwizer, 1995; Vakser, 1996). Isto indica a existência da estreita correlação entre potência biológica e conformação (Rizo et al., 1996). É geralmente aceito que a atividade biológica de um peptídeo está acoplada à sua conformação. Em outras palavras, para ativar uma atividade biológica específica, um peptídeo deve adotar uma conformação que alinha os grupos funcionais essenciais em uma orientação espacial adequada à interação com os receptores celulares (Janin & Chothia, 1990).

Como mediadores em sistemas biológicos complexos e regulados precisamente, os peptídeos possuem uma combinação de flexibilidade e funcionalidade que dão a eles um contrabalanço de propriedades de adaptabilidade e especificidade. Estas questões puderam ser investigadas graças aos avanços crescentes da química de peptídeos que possibilitaram a obtenção de peptídeos de conformação restrita (Struthers et al., 1996). Estes compostos tem

contribuido amplamente para a compreensão dos mecanismos de ação de inúmeros peptídeos biologicamente ativos, para a determinação de suas conformações biologicamente ativas e também para a descoberta de análogos mais potentes (Chamberlin et al., 1995; Wells,1996; Sanderson et al., 1994).

1.2. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Os fundamentos da síntese clássica de peptídeos foram estabelecidos no início deste século por E. Fisher & T.Curtius. Entretanto, o amplo desenvolvimento da área de química de peptídeos se deu somente a partir de 1963, quando B. Merrifield introduziu a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (**Figura 1**; Merrifield, 1963; Stewart & Young, 1984).

A metodologia de síntese em fase sólida se baseia no emprego de um suporte constituído por um polímero insolúvel de estireno/1% divinilbenzeno ao qual se liga a carboxila alfa do primeiro resíduo de aminoácido (este deve ter os seus grupos funcionais de cadeia lateral e amino alfa adequadamente protegidos).

O elongamento do peptídeo é feito através do acoplamento do aminoácido em presença de um reagente acoplador seguido de desproteção do grupamento amino alfa. Estas etapas são repetidas para cada um dos aminoácidos incorporados. Concluído o elongamento, a peptidil-resina é submetida à desproteção total e clivagem da resina na presença de fluoreto de hidrogênio (HF) ou ácido trifluoroacético (TFA). Graças à utilização de suportes insolúveis, o processo de síntese torna-se bastante rápido, pois dispensa as etapas intermediárias de purificação exigidas na síntese clássica em solução (Stewart & Young, 1984; Jacquier, 1989).

Existem duas estratégias de síntese em fase sólida de peptídeos. Estes diferem quanto aos tipos de protetores empregados: tBoc, em que se emprega como protetores os grupos ácido lábeis butiloxicarbonil (tBoc) no grupo amino alfa e derivados do benzil nas cadeias laterais (Stewart & Young, 1984) e Fmoc, em que se emprega o 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) como protetor base lábil do grupo amino alfa e derivados do t-butil nas cadeias laterais dos aminoácidos (Fields & Noble, 1990).

Antes de se iniciar a síntese propriamente dita, é necessário escolher as condições adequadas para que as reações durante as etapas da síntese sejam eficientes e resultem em bons rendimentos do peptídeo desejado. Isto inclui a escolha da estratégia de síntese, grau de substituição do suporte polimérico e dos solventes a serem empregados no elongamento de uma determinada seqüência peptídica. Os solventes devem, por exemplo, solubilizar os reagentes e promover uma solvatação ideal da resina de modo a facilitar a permeação dos reagentes e evitar a agregação das cadeias peptídicas em crescimento. Na maioria das vezes, esta é a causa de dificuldades nos acoplamentos e interrupções indesejadas do elongamento (Sarin et al, 1980).

Devido a rapidez e à sua característica repetitiva, esta metodologia tornou possível a automatização da síntese de peptídeos lineares de seqüências simples e variadas (Bayer, 1991). Por outro lado, esta apresenta uma grande desvantagem em relação à síntese manual no que diz respeito à sintese de "seqüências difíceis" e de peptídeos longos, onde não é possível prever o número de reacoplamentos de um mesmo resíduo necessários para a obtenção do peptídeo desejado. Além disso, para a síntese de uma mesma seqüência, a

automatização pode requerer um gasto significativamente maior de reagentes e solventes do que a síntese manual.

Fica implícito que os avanços atuais feitos na química de peptídeos se deve, em grande parte, a estudos de otimização da metodologia de síntese em fase sólida. Por outro lado, o desenvolvimento nas técnicas de purificação tais como cromatografia líquida em colunas de fase reversa (RP-HPLC; Nugent & Dolan, 1991, Steer et al., 1998) tem contribuído em muito para elevar os graus de pureza dos peptídeos finais obtidos. Mais recentemente, novos protetores de grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos, novos reagentes acopladores (Knorr et al., 1989) e diferentes tipos de resinas tem sido descobertos e, além disso, estratégias alternativas e novos protocolos de síntese tem sido investigados e desenvolvidos (Kania et al., 1994; Varanda & Miranda, 1997).



Figura 1: Etapas da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia t-Boc (Stewart & Young, 1984). n + 2 = número de resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo desejado.

1.3. PEPTÍDEOS DE CONFORMAÇÃO RESTRITA

Os peptídeos sintéticos tem tido uma ampla aplicabilidade nos estudos da relação entre a estrutura e a função de proteínas (Kataoka et. al., 1992; Wrigthon et al., 1996). Como foi mencionado anteriormente, os lineares apresentam uma grande flexibilidade conformacional em solução e somente assumem conformações preferenciais quando ligados aos receptores celulares (Rizo et al., 1996).

A conformação preferencial de um peptídeo pode, no entanto, ser pré-induzida através da introdução de ligações covalentes no seu esqueleto peptídico (Hruby, 1989; Taylor & Ösapay, 1990; Shortle & Sondek, 1995). A restrição conformacional assim imposta poderá torná-lo menos flexível, potenciar sua atividade biológica e aumentar a sua afinidade e/ou seletividade por receptores celulares específicos (Rizo et al.,1996).

Experimentalmente, é possivel restringir a conformação de peptídeos lineares através de ciclizações (**Figura 2**). Os tipos de ciclização mais conhecidos são os seguintes:

- a) "cabeça-cauda", que envolve a incorporação de ponte lactama entre os grupos amino alfa terminal e carboxila alfa terminal de um peptídeo linear (Alsina et al., 1994; Jackson et al., 1995);
- b) "cadeia lateral-cadeia lateral", que envolve a formação de ligação covalente entre as cadeias laterais de determinados resíduos de aminoácidos (Kataoka et al., 1992; Wood, et al., 1992) ou a formação de ligação dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (Misicka & Hruby, 1994; Sieber & Moe, 1996);
- c) "cadeia lateral-grupo terminal", que envolve a formação de lactona intramolecular entre os grupos hidroxila da cadeia lateral (serina ou treonina) e a carboxila alfa terminal (Toniolo, et al., 1990) ou grupo amino alfa terminal (Lebl & Hruby, 1984) de um mesmo resíduo de aminoácido;
- d) acoplamento de aminoácidos químicamente modificados, por exemplo, o resíduo de lisina que pode ter os seus grupos funcionais amino terminal e de cadeia lateral modificados. A modificação de Lys e a ciclização do peptídeo envolvem uma reação entre Ser (um precursor de aldeído) e a cadeia lateral de Lys ligada ao grupo Nterminal do peptídeo na presença de uma base fraca, a Nα-hidroxilamina (Pallin & Tam, 1995).

Outro método descrito na literatura para a restrição da conformação dos peptídeos inclui modificações do tipo "esqueleto-esqueleto" (Kaljuste & Undén, 1994), que são feitas através da inserção no esqueleto peptídico de pequenas moléculas ou *linkers*, tais como o dipeptídeo bicíclico *b-turn* (*b-turn dipeptide*, BTD; Sato et al., 1991), o 1-aminociclopropano 1-ácido carboxílico (Baillie et al., 1994) ou o ácido 6-aminocapróico substituído (Kitagawa et al., 1995).

Apesar da diversidade de métodos químicos para a restrição da conformação de peptídeos, os protocolos atualmente utilizados ainda apresentam muitos problemas não solucionados, tais como:

- a) baixa eficiência de ciclização para peptídeos com mais de 10 resíduos devido a grande barreira entrópica e oligomerização intermolecular (Cavelier-Frontin et al., 1993),
- b) grande dependência da velocidade de ciclização em função do método empregado (Felix et al., 1988),

c) ocorrência de altos níveis de racemização (Bayer, 1991; Spatola et al., 1996).

No entanto, os peptídeos cíclicos assim obtidos mostram-se um pouco mais resistentes à hidrólise por proteases e à degradação em geral, além de apresentarem estruturas mais rígidas em relação aos lineares correspondentes (Jackson et al., 1995). Desta forma, os peptídeos cíclicos consistem em ferramentas poderosas para a otimização da atividade de um peptídeo biologicamente importante, para a elucidação da conformação ativa e para a descoberta de novos agonistas ou antagonistas de hormônios peptídicos ou até mesmo de proteínas nativas (Gurrath et al., 1992; Wells, 1996; Ghiara et al., 1997).



Figura 2: Tipos de ciclização de peptídeos segundo Toniolo, 1990.

1.4. USO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS NO ESTUDO DE POLIPEPTÍDEOS

Até a década de 70, os peptídeos sintéticos eram empregados preferencialmente como substratos na determinação da atividade de proteases (Ruzza et al., 1995), em estudos da relação entre estrutura e função de hormônios peptídicos já conhecidos (Howel et al., 1997) e em terapêutica (Fauchère & Thurieau, 1992; Tam & Spetzler, 1997). Atualmente, utiliza-se peptídeos sintéticos para o mapeamento de epitopos de proteínas (Bosshard, 1995), estudos das especificidades primária e secundária de proteases (Al-Obeidi et al., 1998), busca de seus

inibidores (Burke & Zangh, 1998), estudos de enovelamento de proteínas (Gutte & Klauser, 1995; Imperiali & Ottesen, 1998), estudos das relações estrutura-função ou estruturaconformação de regiões específicas de proteínas (Muir et al., 1997) ou de seus ligantes (receptores, metais, carboidratos, etc.) (Pavone & Pedone, 1995; Basbar et al., 1997; MacInnes & Sykes, 1997; Futaki, 1998).

Vários trabalhos da literatura descrevem o emprego de peptídeos sintéticos no estudo do sistema constituído pelos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), seus receptores celulares (FGFR) e os glicosaminoglicanos heparam sulfato (HS) ou heparina (HEP). Em 1988, Baird e colaboradores sintetizaram peptídeos relacionados a diferentes regiões do FGF-2 que foram testados em ensaios de inibição da ligação do FGF ao seu receptor celular, ligação à HEP e atividades biológicas relacionadas ao FGF (Baird et al., 1988). Em 1993, Bottaro e colaboradores sintetizaram um peptídeo constituído por 24 resíduos de aminoácidos que correspondiam ao fragmento 199-223 do FGFR-2. Este foi capaz de bloquear a atividade mitogênica do fator de crescimento de queratinócitos (KGF ou FGF-7) (Bottaro et al., 1993). Um octadecapetídeo sintético de seqüência relacionada ao suposto domínio de ligação de FGFR-1 à heparina foi capaz de ligar este glicosaminoglicano e inibir ligação de FGF ao FGFR-1 (Kan et al., 1993; 1996). Em 1995, Wong e colaboradores estudaram peptídeos sintéticos com següências relacionadas aos domínios supostamente envolvidos na ligação do FGF-1 a HEP. O peptídeo que possui a següência correspondente ao fragmento 108-120 do hFGF-1 foi capaz de se ligar a derivados da HEP e de antagonizar a atividade mitogênica da proteína, sugerindo que o provável sítio prímário de ligação da proteína à HEP estaria localizado nessa região (Wong et al., 1995). No mesmo ano, Fromm e colaboradores sintetizaram peptídeos derivados do fragmento 110-130 do FGF-1 que forneceram informações sobre a contribuição dos resíduos de Arg e Lys presentes neste para a ligação da proteína à HEP (Fromm et al., 1995). No ano seguinte, Oyama e colaboradores descreveram três peptídeos derivados do sítio 2 do hFGF-1 com atividade agonista 10⁴ vezes menor que a da proteína (Oyama et al., 1996). Em 1997, Fromm e colaboradores descreveram a topologia do sítio de ligação do FGF-1 a heparam sulfato e a derivados oligossacarídicos sulfatados da HEP através do uso de três peptídeos sintéticos relacionados ao fragmento [110-129]FGF-1. O peptídeo com a seqüência idêntica à original foi capaz de se ligar fortemente a esses glicosaminoglicanos (Fromm et al., 1997). Também em 1997, Ray e colaboradores descreveram que um decapeptídeo sintético era suficiente para atividade mitogênica do FGF-2 em células progenitoras neurais (Ray et al., 1997).

Em 1996, Wrighton e colaboradores descreveram um dímero de peptídeo cíclico contendo 14 resíduos de aminoácidos formado por uma ligação dissulfeto intermolecular, que atua como um agonista do hormônio eritropoietina na estimulação de eritropoiese em camundongos. Estes autores determinaram a estrutura cristalográfica do complexo peptídeo-receptor, que revelou, em detalhes atômicos, como as duas moléculas de peptídeo dimerizam os domínios extracelulares do receptor da eritropoietina e induzem o mesmo mecanismo de ativação celular desta última (Wrighton et al., 1996). Em outras palavras, comprovou-se experimentalmente que pequenos peptídeos podem sim ser capazes de mimetizar grandes

hormônios polipeptídicos (Wells, 1996; Livinah et al., 1996).

Os receptores dos FGFs (os FGFRs) também são constituídos por dois ou três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, um domínio transmembrana e um domínio tirosina quinase intracelular (Jaye et al., 1992; Gray et al., 1995) e o provável mecanismo de ativação celular proposto para o sistema FGF, descrito na literatura, é também bastante semelhante a esse determinado para a eritropoietina.

1.5. OS FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS (FGFS) E SEUS SÍTIOS DE INTERAÇÃO

Os FGFs são proteínas estruturalmente relacionadas e ligantes de heparina que constituem uma família de dezenove membros (Venkataraman, 1999).

A expressão destas proteínas nos diversos tecidos de mamíferos está associada a uma variedade de funções biológicas importantes tais como: regulação do crescimento e diferenciação de diversos tipos celulares, angiogênese, cicatrização de feridas e regeneração de neurônios (Yayon et al., 1991). Por outro lado, os FGFs tem sido associados também a processos patológicos diversos como retinopatia diabética, arterioesclerose, crescimento de tumores sólidos e câncer (Gross et al., 1993).

Os FGFs parecem exercer suas atividades biológicas através da interação com receptores celulares específicos com atividade de tirosina quinase (FGFRs) (Neufeld & Gospodarowicz, 1986; Baird & Klagsbrun,1991). Esta interação parece acionar um mecanismo de ativação que se processa através da dimerização dos FGFRs (Ullrich & Schllessinger, 1990; Heldin,1995) e a formação de um complexo constituído por FGF, heparina ou heparam sulfato e os domínios extracelulares dos FGFRs (Baird, 1988). A relação estequiométrica desta interação *in vitro* foi determinada para o FGF-2 através de técnicas de microcalorimetria por Pantoliano e colaboradores (1994). Desta relação (1FGF:2FGFR:1HEP) inferiu-se que os FGFs possuiriam um domínio de ligação à heparina e dois domínios de ligação aos receptores celulares.

Os FGFs -1 e -2 são os mais estudados e apresentam cerca de 55% de homologia em suas seqüências primárias (**Figura 3**). Estas proteínas são denominadas como FGFs ácido e básico por apresentarem pontos isoelétricos de 5,6 e 9,6, respectivamente.

A seqüência primária do FGF-1 humano foi descrita em 1986 por Jaye e colaboradores (Jaye et al., 1986) e a estrutura cristalográfica foi determinada por Zhu e colaboradores (1991) (Zhu et al., 1991). Usando técnicas de cristalografia de raios-X, estes autores mostraram que os FGFs apresentam estruturas tridimensionais do tipo *b-trefoil* constituídas por doze fitas β anti-paralelas que se organizam em torno de um eixo de simetria triaxial formando três alças longas (Murzin et al., 1992).

Estudos de mutagênese sítio-dirigida confirmaram que estas proteínas apresentam dois domínios de ligação, sendo um de alta afinidade e o outro de baixa afinidade pelo receptor celular e que correspondem a duas regiões distintas da proteína: os denominados Sítios 1 e 2 (Springer et al., 1994). Estes sítios devem interagir com regiões distintas do receptor celular, visto que apresentam diferenças químicas e estruturais: o Sítio 1 é descontínuo, predominantemente hidrofóbico e bastante conservado enquanto que o Sítio 2 apresenta um

número de resíduos hidrofílicos variável entre os FGFs e carregados dispostos em seqüência. O Sítio 2 seria constituído por resíduos de aminoácidos da região Y97 - T123 (Imamura et al., 1995) que formam duas fitas β antiparalelas consecutivas (β 10 - β 11) de uma das alças da porção C-terminal (*loop* 3, *hairpin* 3) da molécula de FGF (Murzin et. al., 1992). Esta região parece ser importante não somente para a ligação do FGF ao seu receptor celular (FGFR) e à heparina (Burgess et al., 1991; Ornitz et al., 1996), como também para a dimerização destes receptores (Reich-Slotky et al., 1995). Além disso, parece estar também envolvido na determinação de especificidade para as diferentes isoformas de FGFRs (Blaber et al, 1996).

1 10 • • • 20 30 40 FGF-1 MAEGEITTTFTALTEK-FNLPPGNYKK PKLLYCSNGG HFLRILPDGT VDGTRDRSDO GSITTLPALPEDG-GSGAFPPGHFKD PKRLYCKNGG FFLRIHPDGR VDGVREKSDP FGF-2 50 60 70 80 90 FGF-1 HIQLOLSAES VGEVYIKSTE TGOYLAMDTD GLLYGSOTPN EECLFLERLE FGF-2 HIKLQLQAEE RGVVSIKGVC ANRYLAMKED GRLLASKCVT DECFFFERLG 100 110 • •120 • 130 FGF-1 ENHYNTYISK KHAEKNWFVG LKKNGSCKRG PRTHYGQKAI LFLPLPVSSD FGF-2 SNNYNTYRSR KYTS--WYVA LKRTGOYKLG SKTGPGOKAI LFLPMSAKS

Figura 3. Alinhamento das seqüências primárias dos FGFs -1 e -2 humanos (Venkataraman et al., 1999). - - resíduos sugeridos por Springer e colaboradores (1994) como constituindo o Sítio 1 de ligação ao receptor; - - resíduos sugeridos como constiuindo o sítio de ligação à heparina; resíduos sublinhados- região que contém o Sítio 2 de ligação ao receptor.

Na estrutura cristalográfica descrita por Zhu e colaboradores, o Sítio 2 se localiza em uma dessas alças (*loop* 3), numa região (*hairpin* 3) constituída por duas fitas β anti-paralelas consecutivas (β 10 - β 11) (Zhu et al.,1991; Blaber et al., 1996; **Figura 4**). Os resíduos de aminoácidos contidos neste sítio foram sugeridos como envolvidos na ligação do FGF-2 aos receptores celulares (Baird et al.,1988).

O FGF-1 é o único que se liga a todas as isoformas do FGFR e é capaz de induzir a síntese de DNA em diferentes linhagens de células expressando as diferentes isoformas do receptor (Ornitz et al., 1996). Essas afirmações são apoiadas por dados de estudos de mutagênese dirigida ao sítio e de modificações químicas deste segmento no FGF-1 bovino. Por exemplo, o resíduo K118 foi identificado como sendo essencial para a atividade biológica dessa proteína (Harper & Lobb, 1988; Burgess et al.,1991; Maciag et al., 1995). Em seguida, este resíduo, K113, R119 e R122 foram propostos como sendo os prováveis ligantes do FGF-1 à HEP (Volkin et al.,1993; Thompson et al.,1994). Posteriormente ainda, foi sugerido que o sítio de reconhecimento primário para HEP seria formado por resíduos de aminoácidos do segmento 95-128 do FGF-1 humano (Springer et al.,1994). Além disso, um peptídeo linear correspondente a este segmento mostrou alta afinidade para heparina imobilizada e foi capaz de inibir a atividade mitogênica do FGF-1 humano na presença deste glicosaminoglicano

(Wong et al., 1995).

Os trabalhos mais recentes de mutagênese sítio-dirigida descrevem outros resíduos de aminoácidos localizados na vizinhança do Sítio 1 do FGF-2 (Glu 87 e Asn 95) como sendo essenciais para a ligação de alta afinidade aos receptores (Zhu et al, 1995; Zhu et al., 1997). Alguns peptídeos sintéticos relacionados a uma região localizada entre os Sítios 1 e 2 se mostraram mitogênicos em células progenitoras neurais. Assim, foi sugerida a possibilidade da existência de um novo sítio de ligação na molécula de FGF-2 aos seus receptores (Ray et al., 1997). Devido a todos estes fatos, um "sítio" assim definido deve ser visto no modo operacional representando parte de toda uma superfície que faz contato com o FGFR.



Figura 4: Estrutura tridimensional do FGF-1 humano (Zhu et al., 1991; Blaber et al.,1996).

1.6. OS RECEPTORES DOS FGFS, O HEPARAM SULFATO E A HEPARINA

Os FGFRs são os reguladores do desenvolvimento e homeostase do tecido adulto que conectam a matriz peri-celular ao ambiente intracelular. A combinação entre os diversos membros das famílias dos FGFs, os receptores FGFRs e os receptores proteoglicanos heparam sulfato (HS) formam os complexos FGFR ativos e específicos da transdução de sinal (McKeehan et al., 1998).

A família dos FGFRs consiste de produtos de quatro genes, sendo que alguns destes genes dão origem a um grande número de isoformas de FGFR por *splicing* alternativo combinatorial ao nível da transcrição e possivelmente por modificação pós-traducional (Johnson & Williams, 1993; McKeehan et al., 1998, Zhang, 1999).

As isoformas dos FGFRs -1 a -4 diferem entre si em suas porções extracelulares. Estas últimas podem ser constituídas por dois ou três domínios do tipo imunoglobulina (DI, DII e DIII), sendo o DI presente nas formas alfa (α) e ausente nas formas beta (β) destes receptores. Além disso, os domínios DIII dos FGFRs -1, -2 e -3 são variáveis e suas isoformas

resultantes são referidas como IIIa, IIIb e IIIc (Ornitz et al., 1996). As seqüências primárias dos domínios DII e DIII do FGFR1-β estão mostradas na **Figura 5**.

Os domínios extracelulares destes receptores determinam a especificidade de ligação e a dimerização induzida pelo ligante (Wang et al., 1995). Os FGFRs apresentam, portanto, propriedades únicas de ligação e exibem diferenças quanto à afinidade e à especificidade com que ligam os diferentes membros da família dos FGFs (Goldfarb, 1996). Esta especificidade é determinada pelas diferenças individuais nas estruturas primárias entre os FGFRs e entre os FGFs (Ornitz et al., 1996). Como já citado no ítem anterior, o FGF-1 é o único ligante que não tem preferência por nenhuma das isoformas do FGFR, ou seja, liga-se indistintamente a qualquer uma delas, sendo capaz de induzir resposta de proliferação em diferentes linhagens celulares que expressam esses receptores (Blaber et al., 1996).

DII[59-161]:RMPVAPYWTS PEKMEKKLHA VPAAKTVKFK CPSSGTPNPT LRWLKNGKEF KPDHRIGGYK VRYATWSIIM DSVVPSDKGN YTCIVENEYG SINHTYQLDV VER

DIII[166-270]: PILQAGLPAN KTVALGSNVE FMCKVYSDPQ PHIQWLKHIE VNGSKIGPDN LPYVQILKTA GVNTTDKEME VLHLRNVSFE DAGEYTCLAG NSIGLSHHSA WLTVL

Figura 5: Seqüências primárias dos domínios DII e DIII do FGFR 1 **b**(Zhang et al., 1999).

O proteoglicano (HS) integra o complexo FGFR, parece exibir especificidade e diversidade iguais ou maiores do que os FGFs ou os FGFRs e é mimetizado pela HEP (Faham et al., 1996; McKeehan et al., 1998). Esta é estruturalmente semelhante à porção sacarídica do HS: ambas consistem em polímeros lineares aniônicos de unidades repetitivas do dissacarídeo básico formado por ácido L-idurônico e D-glicosamina. Estes, por sua vez, estão ligados entre si por ligações α 1-4 e possuem grupos sulfatos heterogeneamente ligados em diferentes posições (Faham et al., 1996; **Figura 6**).

A interação entre a HEP e a molécula de FGF parece causar uma diminuição na flexibilidade desta última, o que levaria à estabilização de sua estrutura tridimensional (Gospodarowicz & Cheng, 1986; Pineda-Lucena et al., 1996). Desta forma, a HEP parece exercer um importante papel na modulação da afinidade dos FGFs pelos seus receptores e, consequentemente, na regulação dos mecanismos de ligação e desligamento destes fatores mitogênicos da superfície celular (Flaumenhaft et al., 1990; Vodavsky, 1991).

O fato de os FGFs apresentarem grande afinidade por este glicosaminoglicano (Baird & Klagsbrun, 1991) tem sido amplamente explorado nos processos de purificação dos FGFs, através de cromatografia de afinidade em coluna de HEP-Sepharose (Shing et al., 1984).

Em 1986, Gospodarowicz & Cheng descreveram que a HEP estabilizava a conformação biologicamente ativa dos FGFs -1 e -2, protegendo-os de inativação por proteólise e desnaturação sob extremos de pH ou aumento de temperatura. Também foi

demonstrado que a administração de heparina exógena potenciava de forma dramática a atividade mitogênica do FGF-1 sobre fibroblastos em cultura, fenômeno este não observado para o FGF-2 (Moscatelli, 1987).

A presença de HEP ou HS parece não ser essencial para a formação do complexo FGF-FGFR, mas sim para a estabilização do complexo formado (Volkin et al., 1993; Fannon & Nugent, 1996). Entretanto, a análise das coordenadas cristalográficas do FGF-2 co-cristalizado com um hexassacarídeo de HEP obtidas por Faham e colaboradores (1996) comprovou a existência de um sítio de ligação à heparina constituído pelos resíduos de aminoácidos K17, N18, N 95, R113, K118, Q127 e K128 na molécula de FGF-2.

Em 1998, Digabriele e colaboradores determinaram a estrutura cristalina de um dímero biologicamente ativo do hFGF-1 complexado com um decassacarídeo homogêneo totalmente sulfatado de HEP e demonstraram que HEP dimeriza o FGF-1 em solução sem que houvesse a formação de uma interface proteína-proteína. Segundo esses autores, o sítio de ligação à HEP na molécula de hFGF-1 seria formado por N18 e por cadeias laterais localizadas na superfície de uma alça constituída pelos resíduos 112-128. No modelo proposto por estes autores, as interações entre o hFGF-1 e a HEP ocorreriam através de contatos iônicos entre os resíduos de aminoácidos básicos da proteína e grupos sulfatos ou carboxilatos de diferentes oligossacarídeos de HEP. Neste modelo, as longas cadeias laterais dos aminoácidos básicos parecem conferir à proteína uma flexibilidade conformacional de modo a acomodar as diferenças de sulfatação da HEP e direções alternativas da cadeia polissacarídica. Além disso, um octassacarídeo se constituiria na menor unidade de HEP biologicamente ativa.

Bittoün e colaboradores (1999) mostraram, através de estudos de fluorêscencia e dicroísmo circular, que o hexassacarídeo derivado da HEP, a benzilamida de carboximetildextrana (CMDB), descrito como sendo um antagonista da atividade mitogênica do FGF-2, liga-se diretamente ao sítio de ligação do FGF-2 à HEP. Segundo esses autores, a interação entre o CMDB e o FGF-2 parece causar uma mudança conformacional na proteína, modificando suas propriedades de ligação ao receptor.

Por outro lado, McKeehan e colaboradores (1999) decreveram recentemente uma fração da HEP comercial, a fração anticoagulante, que se liga æ FGFR imobilizado como sendo requerida para a formação do complexo binário FGF-FGFR que leva à estimulação de síntese de DNA em células endoteliais pelo FGF-1 (McKeehan et al., 1999).



Figura 6: Dissacarídeo que se constitui na unidade estrutural repetitiva da molécula de heparina (Fahan et al., 1996).

1.7. DADOS ESTRUTURAIS DOS COMPONENTES DO COMPLEXO FORMADO POR FGF-FGFR-HEP E MODELOS DE INTERAÇÃO

Até o momento não existem dados estruturais dos FGFRs ou do complexo FGF-FGFR experimentalmente determinados. Todos os dados disponíveis na literatura se baseiam em resultados obtidos em estudos de mutagênese sítio-dirigida dos FGFs (Springer et al., 1994) ou dos FGFRs (Gray et al., 1995; Wang et al., 1995), no uso de peptídeos sintéticos derivados das proteínas e/ou (Baird et al., 1988, Bottaro et al., 1993) e na cristalografia de difração de raios X da proteína livre (FGF-2 ou FGF-1) (Zhu et al., 1991; Blaber et al., 1996) ou co-cristalizada com hexassacarídeo ou outros derivados da HEP (Faham et al., 1996, Digrabriele et al., 1998) descritos acima ou ainda, em análises da proteína por RMN (Moy et al., 1996; Pineda-Lucena et al., 1996; Blaber et al., 1997, Ogura et al., 1999). Estes serviram de base para a proposição dos diversos modelos do complexo FGF-FGFR-HEP.

Todos estes modelos tem em comum a busca pelo entendimento dos mecanismos de ativação celular pelo FGF, de dimerização das moléculas de FGFR, de transdução de sinal e da resposta de proliferação celular. O que varia dentre os diversos modelos descritos na literatura é a estequiometria de formação do complexo FGF-FGFR-HEP e a orientação relativa entre estes componentes (Bateman & Chothia; 1995; Wang et al., 1997; Waksmann & Herr, 1998). Os modelos de Pantoliano e colaboradores e de Springer e colaboradores, embasados na estrutura do complexo receptor-ligante do hormônio do crescimento, propõem uma estequiometria de 1FGF:2FGFR:1HEP (Pantoliano et al., 1994; Springer et al., 1994). Já outros (Xu et al., 1992; Kan et al., 1993; Digabriele et al., 1998; Venkataraman et al., 1999; Moy et al., 1997; Huhtala et al., 1999, Hsu et al., 1999) propõem uma estequiometria de 1FGF:1FGFR ligados por 1 ou 2 cadeias de HEP ou HS, formando complexos ternários com FGF-FGFR (Wang et al., 1999).

Recentemente, propusemos um modelo teórico da estrutura dos domínios DII e DIII extracelulares do FGFR-1β (Oyama et al., 1997). A partir do posicionamento gráfico da molécula de hFGF-1 e a de um hexassacarídeo de HEP junto ao modelo de FGFR-1β, propusemos um modelo de interação entre os três componentes. Deste trabalho resultou a proposição de síntese e caracterização química e biológica de três peptídeos com seqüências homólogas a regiões do receptor como possíveis ligantes de hFGF-1 (Oyama et al., 1999).

1.8. ANÁLISE CONFORMACIONAL DE PEPTÍDEOS

A determinação da conformação ativa de um peptídeo é um dos mais ambiciosos e difíceis alvos a serem atingidos. Esta afirmação se torna perfeitamente compreensível quando se considera os seguintes fatos:1) a maioria dos peptídeos biologicamente ativos apresentam grande flexibilidade conformacional; 2) estes compostos assumem suas conformações ativas somente quando em presença de seus receptores (Schwizer, 1995); 3) estes compostos não mantém suas estruturas funcionais quando isolados na forma cristalina ou quando em soluções aquosas (Taylor & Ösapay, 1990; Rizo et al., 1996; Wells, 1996).

A possibilidade de sintetizar análogos de conformação restrita combinada aos avanços nos métodos de análise estrutural de peptídeos tem propiciado à comunidade científica contribuições relevantes em termos da determinação dos requisitos estruturais para a atividade biológica e especulação da conformação ativa e possível mecanismo de ação de alguns peptídeos e proteínas de grande importância biológica.

As técnicas de modelagem molecular e espectroscopias de dicroísmo circular (Polesi et al., 1996), de fluorescência (Pesce et al., 1971; Ito et al., 1993), de infravermelho com transformada de Fourier (IR-FT; Hollosi et al., 1994) e de ressonância magnética nuclear (RMN; Tilley et al., 1992, McInnes et al. 1997 Gauthier et al, 1997) tem sido as mais amplamente empregadas nestes estudos (Nikiforovich & Marshall, 1993).

A <u>modelagem molecular</u> é um método computacional de análise estrutural de moléculas que emprega parâmetros matemáticos (sob a forma de algorítmos) dos átomos que as constituem: 1) para cálculos teóricos de suas propriedades dinâmicas; 2) para construção de estruturas a partir das coordenadas atômicas determinadas pelos métodos experimentais disponíveis tais como RMN ou cristalografia por difração de Raio-X (Pettit et al., 1986; Brooks et al., 1988; Brooks III, 1995). Uma molécula peptídica é usual e classicamente tratada como uma coleção de átomos cujas interações podem ser descritas pela mecânica Newtoniana em um processo chamado Mecânica Molecular onde a função eletrônica é ignorada. A Mecânica Molecular pode representar a força de interação tanto entre os átomos ligados entre si como daqueles que não estão ligados (interação espacial).

A análise estrutural é baseada nos princípios físico-químicos que regem a estruturação de uma molécula tais como: raio atômico, distribuição de carga na molécula e diferentes constantes de força que representam graus de liberdade interna (Honig, 1995). Neste tipo de análise, uma molécula é descrita em termos de um campo de força clássico ou função potencial, o que possibilita a "visualização" não apenas de sua estrutura tridimensional como também de sua mobilidade, uma vez que os átomos que as constituem estão em constante movimento em condições normais de temperatura (Honig, 1995). Diferentes campos de força podem empregar diferentes representações matemáticas das forças das ligações e interações entre os átomos. Cada campo de força difere quanto aos parâmetros que são incluídos ou considerados nas equações matemáticas.

Desta forma, uma estrutura é gerada através de algorítmos (*distance geometry*) que criam uma matriz das distâncias interatômicas entre todos os átomos da molécula em questão em um espaço multi-dimensional. Este grupo de valores de distâncias é então projetado para um espaço tridimensional de coordenadas cartesianas, gerando a primeira versão de uma determinada estrutura, ou seja, a estrutura inicial. A etapa seguinte consiste em um refinamento dessas coordenadas cartesianas através de algorítmos de minimização da energia potencial com a finalidade de se encontrar um ponto de convergência de mínima energia potencial para aquela estrutura (Evans, 1996). A minimização de energia consiste, portanto, na otimização da geometria de uma determinada conformação em direção a uma configuração da molécula cuja energia é mínima. Pela determinação de um grupo de confôrmeros de baixa energia tenta-se gerar a descrição de um estado de equilíbrio e evitar as limitações inerentes às representações estáticas das possibilidades conformacionais de uma determinada molécula. Os algorítmos mais comumente empregados nesta etapa de otimização da geometria, no caso

de uma análise teórica, são os seguintes: *steepest descent* e *conjugated gradient*. Ainda na mesma etapa, para o caso de otimização de estruturas construídas a partir de coordenadas atômicas experimentalmente obtidas, estes algorítmos podem incluir implementações dos dados de restrições de RMN tais como distâncias interatômicas, desvios das coordenadas em relação às distâncias das ligações e ângulos diedros ($\phi e \psi$) (Kirkpatrick et al., 1983; Wilson & Cui, 1990).

As propriedades dinâmicas de uma molécula podem ser calculadas por meio de diversos programas de simulação de dinâmica molecular que consiste em elevar a temperatura do sistema para que ocorra um aumento da energia cinética da molécula possibilitando uma exploração do seu espaço conformacional. Nesta etapa, outros parâmetros que simulam os efeitos de solvente e de ionização da molécula em questão são considerados ou pela adição de moléculas de solvente no sistema ou pela imposição de valores de constante dielétrica correspondente àquele solvente e de pH (Perkins & Pettit, 1992). Esses programas permitem o registro de coordenadas dos diversos confôrmeros em intervalos de tempo regulares. Os confôrmeros constantes neste registro são resfriados pelo abaixamento da temperatura do sistema, e novamente submetidos à minimização de energia para que suas geometrias sejam otimizadas. A superposição das estruturas resultantes permite a comparação de suas coordenadas, a determinação dos respectivos desvios (*root mean square deviatior*; RMSD) e o agrupamento dessas em famílias de conformações. A qualidade das estruturas finais é medida em termos de desvios RMS, sendo que valores menores do que 2Å indicam que a estrutura calculada deve ser muito próxima da estrutura real.

Assim, a modelagem molecular possibilita não apenas um entendimento das forças físicas que determinam a estrutura molecular, como também das modificações dessa estrutura dentro do seu espaço conformacional. Esta análise fornece dados sobre energia potencial dos possíveis confôrmeros e das conformações preferencialmente assumidas pela molécula nas condições em que a análise é feita (Vakser, 1996).

A <u>espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</u> é um método que consiste em medir as mudanças de orientação do spin nuclear de átomos que possuam momento magnético (μ) diferente de zero, como é o caso de ¹H, ¹³C e ¹⁵N. Quando submetidas a um campo magnético, a absorção da radiação eletromagnética por esses núcleos, em uma determinada frequência, é governada pelas características estruturais da molécula. Desta forma, este método não somente quantifica o número de ¹H, de ¹³C ou de ¹⁵N existentes na molécula, como também fornece informações estruturais de suas interações e ambiente em que se encontram dentro da estrutura (Wütrich, 1986; Evans, 1995).

A intensidade de campo necessária para a absorção de energia por um determinado próton (assim referidos os núcleos de ¹H) em relação a um padrão (o deslocamento químico), depende de seu ambiente próximo, ou seja, da estrutura molecular à qual ele pertence. O sinal de absorção de energia por estes núcleos pode, portanto, apresentar desdobramentos devido à transferência de magnetização decorrente de interações dipolo-magnéticas ou acoplamentos entre núcleos vizinhos. Sendo assim, o espectro de RMN de uma amostra possibilita a dedução
da estrutura molecular local.

Os espectrômetros atuais consistem de magnetos muito potentes (>500 MHz) o que possibilita uma grande resolução entre os picos ou sinais de ressonância dos núcleos que constituem os complexos sistemas de *spins* das biomoléculas.

As análises conformacionais de peptídeos em solução por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) são geralmente realizadas através de experimentos de ¹H-RMN e ¹³C-RMN. Os passos experimentais dos protocolos geralmente utilizados para essas análises são os seguintes:

- aquisição dos espectros unidimensionais (RMN-1D) e análise dos sinais de ressonância exibidos pelos prótons existentes no peptídeo e determinação dos respectivos deslocamentos químicos.
- identificação do sistema de spins presente no peptídeo por ressonância magnética nuclear bidimensional (RMN-2D).
- identificação da conectividade de ligações (experimentos de COSY, Marion & Wütrich, 1983; Rance et al., 1983) e da conectividade espacial até 5 ligações (NOESY, Jeener et al., 1982; ROESY, Rance 1987 e TOCSY, Griesinger et al., 1988).
- 4. atribuição sequencial dos sinais de ressonância observados nos espectros aos sistemas de spins da molécula.
- 5. determinação e identificação das conectividades a longa distância (*tertiary long range NOE's*).
- classificação dos NOEs por meio de tabelas para comparação de distâncias das ligações, (Método de Wishart, por exemplo) (Wishart et al.,1992;1995).
- 7. análise das constantes de acoplamento (J) e determinação aproximada dos ângulos de torsão.
- identificação de elementos de estrutura secundária regular e interpretação dos espectros de NOE e dados de deslocamentos químicos do H de Namida (backbone amida exchange data).
- proposição da estrutura tridimensional (3D) com base nas distâncias inter-prótons aproximadas e restrições dos ângulos de torsão (*torsion angle restraints*) por construção de modelos (*Model Building*) e refinamentos desta estrutura 3D através dos dados de estrutura obtida por cristalografia de Raio-X (se já estiverem descritos) e dinâmica molecular.

Os experimentos de RMN diferem entre si, principalmente quanto ao pulso (que podem ser aplicados em diferentes ângulos como função de tempo) e ao *mixing time* (tmix, como no caso do ROESY). Estes experimentos permitem identificar os sistemas de spins de cada residuo de aminoácido e determinar as constantes de acoplamento (J) de cada interação. Por outro lado, os experimentos de NOESY e ROESY podem refletir as interações espaciais entre os prótons de um peptídeo. Além disso, as atribuições dos sinais de RMN observados nos espectros obtidos por estes experimentos fornecem informações também sobre a seqüência do peptídeo em estudo (Wüthrich, 1986).

A prova estrutural de RMN mais comumente utilizada é o efeito nuclear de Overhauser (NOE), que se origina de uma interação dipolar entre dois núcleos que estão em estreita

proximidade no espaço. A intensidade dos picos nos espectros de NOESY é proporcional ao inverso da distância entre os dois núcleos elevado à sexta potência. Em princípio, qualquer par de núcleos que estão a uma distância de 4 a 5 Å dão origem a picos de NOEs observáveis. Os NOEs podem ser classificados por meio de tabelas para comparação das distâncias das ligações [NOEs $d_{\alpha N}$ (i, i+1); d_{NN} (i, i+1); $d_{\alpha N}$ (i, i+3) e $d_{\alpha \beta}$ (i, i+3) que são característicos de hélices; $d_{\alpha \alpha}$ e baixos valores de $d_{\alpha N}$ são característicos de β-fitas e $d_{\alpha \beta}$ (i, i+2) característico de *turns* reversos; Método de Wishart] (Wishart, 1992; Evans, 1995). Os NOEs sequenciais fornecem informações sobre a população relativa das conformações do esqueleto peptídico (Polesi et al., 1996). Os diferentes padrões de conectividades dos NOEs, interpretados com o auxílio do diagrama de energia conformacional de Ramachandran, fornecem informações sobre os ângulos $\phi = \psi$. Estes estão associados a diferentes conformações preferenciais (α , β , etc.)(Wüthrich, 1986; Evans, 1995).

Os dados estruturais de uma determinada conformação obtidos a partir dos experimentos de RMN são específicos de sítios ou pares de átomos de uma molécula. Entretanto, devido ao fato de que estes experimentos detectam fenômenos que ocorrem em uma escala de tempo muito pequena (10⁻⁵ – 10⁻³ s), um número variável de configurações consistentes com os dados obtidos podem revelar a coexistência de diversos estados conformacionais estáveis e discretos ou interconversões entre diferentes estados conformacionais ocorridas durante o tempo de observação (Dyson & Wrigth, 1991; Kopple et al., 1993). Isto torna a interpretação dos espectros de RMN difícil e complexa (Dyson & Wrigth, 1995). O resultado da análise estrutural por RMN é um grupo de estimativas de distâncias e orientações relativas entre pares específicos de átomos denominadas restrições de cujas médias ponderadas não se traduzem em uma simples estrutura, mas em modelos de estruturas (Martz, 1999). A estrutura tridimensional obtida pela análise por RMN é uma média entre as possíveis conformações do espaço conformacional que obedecem às restrições de RMN.

A espectroscopia de RMN é, portanto, uma técnica capaz de detectar a presença de confôrmeros de um peptídeo em solução.

Embora as conformações preferenciais de pequenos fragmentos peptídicos lineares possam não refletir a conformação desta mesma seqüência quando na proteína nativa, existem numerosos exemplos onde as estruturas nascentes presentes nos peptídeos em solução, detectadas por CD ou RMN, refletem muito fielmente a sua conformação na proteína ou no estado ligado (Dyson et al., 1992; MacArthur et al., 1994).

A <u>espectroscopia de dicroísmo circular</u> é uma técnica relativamente simples e poderosa para o estudo dos elementos de estrutura secundária (α -hélices, estruturas β e β -*turns*) e para a quantificação de frações destes, os quais contribuem na determinação da conformação global de peptídeos e proteínas em solução (Dyson & Wright, 1995).

Esta técnica é uma variação da espectroscopia de absorção, sendo o dicrógrafo circular uma simples variação do espectrofotômetro de absorção normal. O dicrógrafo circular é basicamente um espectrofotômetro configurado para medir a diferença entre absorbância de

luz circularmente polarizada para a direita e absorbância de luz circularmente polarizada para a esquerda de uma dada amostra (Johnson, 1985).

A maioria das moléculas biológicas contém algumas unidades eletrônicas que absorvem luz de maneira quase independente chamadas cromóforos. Estes podem estar dispostos assimetricamente no espaço (Johnson, 1985; Sreerama & Woody; 1993). Os peptídeos e as proteínas são oticamente ativas pois apresentam assimetrias tanto do tipo configuracional como conformacional. Tais moléculas assimétricas absorvem luz circularmente polarizada para a direita diferentemente da luz circularmente polarizada para a esquerda, sendo que: 1) somente moléculas quirais mostram uma absorção preferencial por luz circularmente polarizada para a direita ou para a esquerda; 2) somente estruturas ou moléculas quirais, como é o caso dos peptídeos e proteínas, mostram uma dispersão preferencial de uma polarização sobre a outra por incidência de luz polarizada circularmente.

Na espectroscopia de CD, a luz circularmente polarizada tanto para a direita (R) como para a esquerda (L) obedecem a lei de Beer. Assim, a diferença obedece a seguinte equação:

$$A_{L}(\lambda)-A_{R}(\lambda) = \Delta A(\lambda) = [\varepsilon_{L}(\lambda) - \varepsilon_{R}(\lambda)] / c,$$

onde, *A* é a absorbância medida e varia com o comprimento de onda *I*, *I* é o caminho ótico da célula em cm, *c* é a concentração da amostra em moles x L^{-1} e *e* é o coeficiente de extinção molar, característico de cada molécula, em L x mol⁻¹ x cm⁻¹.

A diferença entre as absorbâncias medidas é relacionada com a elipticidade $\Delta A = \theta/32,98$, onde θ é expresso em *degree* (deg).

Os espectros de CD podem ser expressos também em termos de elipticidade molar [θ] = ($\theta \ge 100 \ge PM/n$)/c $\ge 1 \ge 10$, onde *n* é o número de moles, *l* é o caminho ótico em cm, e *c* é a concentração da amostra em mM. As bandas podem ser positivas ou negativas, dependendo do tipo de luz absorvida mais fortemente, e são evidenciadas somente em comprimentos de onda para os quais existem bandas normais de absorção. A região de comprimento de onda nos espectros de CD que fornece as informações estruturais de um peptídeo está compreendida entre 170 e 240 nm onde os grupos amidas, as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e as pontes dissulfeto exibem uma sobreposição de múltiplas bandas de absorção.

Um espectro característico de peptídeo com conformação helicoidal mostra três bandas de CD sendo que aquela com elipticidade positiva se localiza na região de comprimento de onda ao redor de 190 nm e as outras duas com elipticidades negativas aparecem em comprimentos de onda de 208 e 222 nm. Estes tipos de espectros podem fornecer uma estimativa da população média de hélices ordenadas assumidas por um peptídeo em solução. Em contraste, o espectro de uma cadeia peptídica arranjada randomicamente exibe uma banda negativa no espectro de CD centrada em 199 nm. Por outro lado, embora uma estrutura *b-turn* do tipo I exiba geralmente um espectro de CD semelhante àquele de α -hélice, a presença de populações significativas de confôrmeros *b-turns* em solução pode ser detectada pela observação de uma banda com elipticidade positiva em 200-210 nm (Rose et al., 1985; Dyson & Wright, 1995).

Os espectros de CD de peptídeos ou proteínas podem ser relacionados como uma função da orientação relativa entre cromóforos responsáveis por suas atividades quiro-ópticas. Estes espectros são sensíveis a quaisquer fatores externos tais como: a natureza do solvente, concentração do composto em questão, temperatura e concentração salina ou fôrça iônica, que promovem variações nas condições de interações intermoleculares e de solvatação e podem influenciar na conformação global daqueles compostos (Zhong & Johnson, 1992). Na literatura existem relatos sobre segmentos com uma mesma seqüência de aminoácidos que foram capazes de adotar diferentes configurações ora em α -hélices ora em fitas β quando foram analisados em diferentes condições (Kuwagima et al., 1987; Pan et al., 1993).

O ambiente é um fator importante na organização e estabilização da estrutura secundária de uma determinada seqüência de aminoácidos (Li & Deber, 1993; Liu & Deber, 1998). O ambiente das membranas biológicas, por exemplo, fornece uma matriz de solvatação muito diferente do que a água e, como conseqüência, as moléculas tendem a um comportamento estrutural diferente do que aquele em meio aquoso. Diferentes solventes orgânicos que apresentam valores de constantes dielétricas entre o da água e o de um solvente apolar tem sido amplamente utilizados para mimetizar os diferentes compartimentos das membranas biológicas: o compartimento aquoso por PBS 10 mM, pH 7,2, a superfície carregada por um detergente aniônico (SDS) e o interior da membrana hidrofóbica pelo TFE (Liu & Deber, 1998).

Solventes tais como metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetonitrila, 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e altas concentrações de dodecil sulfato de sódio (SDS) são conhecidos por afetarem o ambiente de tal forma a modificar a preferência conformacional individual dos aminoácidos presentes nos peptídeos e proteínas (Zhong & Johnson, 1992).

O TFE e o MeOH são solventes hidrofílicos e formadores de pontes de hidrogênio que estabilizam os peptídeos na estrutura secundária esperada e deduzida em função das preferências dos aminoácidos isolados. Estes solventes tem a reputação de promover a estruturação em α -hélice. Por outro lado, a literatura descreve a formação de fitas β estáveis nestes solventes (Shiraki et al., 1995; Segawa et al., 1990).

O SDS é um tensoativo de natureza anfifílica que mimetiza o ambiente usualmente hidrofóbico do interior de uma proteína ou ainda a superfície de uma membrana biológica (Ruzza et al., 1995). Em altas concentrações, o mesmo forma micelas e é conhecido como estabilizador de estruturas α -helicoidais, enquanto que baixas concentrações de SDS induzem estruturas β (Wu & Yang, 1980; Wu et al.,1981).

2. PROPOSIÇÃO

Como já foi citado, os peptídeos sintéticos tem tido grande destaque na literatura em função de sua ampla aplicabilidade no desenvolvimento de pesquisa em bioquímica (Chorev et al., 1991; Fauchère & Thurieau, 1992; Sanderson et al., 1994; Gutte & Klauser, 1995; Muir et al., 1997; Tam & Spetzler, 1997; Al-Obeidi et al., 1998; Burke & Zangh, 1998). Como exemplo, os mesmos podem auxiliar na busca de agonistas ou inibidores peptídicos efetivos de proteínas de grande importância biológica (Wells, 1996; Wrighton et al., 1996).

Diversos peptídeos lineares derivados da Região 2 do h-FGF-1 foram anteriormente sintetizados em nosso laboratório. Alguns deles se mostraram agonistas da atividade mitogênica da proteína, apesar de suas potências terem sido notoriamente reduzidas (10⁴ vezes menos ativos do que o FGF-1 nativo). Os peptídeos Ac-YISKKHAEK-NH₂ e Ac-GLKKNGSSKRGPRT-NH₂ foram praticamente inativos em cultura de fibroblastos Balb/c 3T3, enquanto que Ac-SKKHAEKNWFVGLKKN-NH₂ e Ac-WFVGLKK-NH₂ foram mitogênicos com ED_{50} =10-20 µM. Estes dois últimos também foram capazes de inibir a resposta mitogênica do ID₅₀=100-200µM ligar hFGF-1 com е de se а HEP-Sepharose. Já Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ foi mitogênico (ED₅₀ 30-50 µM) e capaz de competir com hFGF-1 pelos receptores celulares com ID₅₀ 10-30 µM e de se ligar à HEP-Sepharose (Oyama et al., 1996).

No presente trabalho, nos propusemos a desenhar, sintetizar, purificar, caracterizar, testar e analisar a estrutura de novos peptídeos derivados da região 2 do hFGF-1 (fragmento 97-132 segundo a numeração de Jaye et al., 1992) conforme descrito no **Esquema 1**.

A escolha da região 2 se baseou nas informações fornecidas nos itens 1.4. a 1.7. da Introdução.

Os objetivos principais deste estudo foram:

- contribuir para a elucidação dos requisitos estruturais necessários para a expressão da atividade mitogênica dos peptídeos derivados da região 2 do hFGF-1 e, como reflexo, da própria proteína;
- 2. obter peptídeos de conformação restrita que fossem agonistas, antagonistas ou inibidores do FGF-1 humano e que pudessem ser potencialmente úteis em pesquisa e terapêutica.

Em paralelo, sintetizamos, purificamos, caracterizamos e testamos dois peptídeos lineares relacionados aos *loops* DE e FG do domínio DIII do receptor FGFR1β (**Esquema 2**). Tais peptídeos foram desenhados como possíveis ligantes do sítio 2 do hFGF-1 em um projeto colaborativo em desenvolvimento sob co-orientação da Dra. Miranda (S.Oyama Jr, Tese de Doutoramento em preparação).

Alguns dos peptídeos obtidos foram submetidos à análise estrutural em solução.

ESQUEMA 1: Esquema geral do trabalho realizado com os peptídeos derivados do hFGF-1



ESQUEMA 2: Esquema geral do trabalho realizado com os peptídeos derivados do FGFR-1**b**



3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e os métodos empregados para a realização deste trabalho estão descritos a seguir.

3.1. DESENHO DE PEPTÍDEOS

Inicialmente, realizamos uma análise detalhada da estrutura tridimensional da região do hFGF-1 que contém o Sítio 2. Para tanto, construímos a estrutura do hFGF-1 com base nas coordenadas cristalográficas determinadas originalmente por Zhu e colaboradores (1991) para o FGF-1 bovino (Zhu et al., 1991). Esta estrutura foi posteriormente refinada com base nas coordenadas cristalográficas determinadas para o hFGF-1 por Blaber e colaboradores e disponíveis no *Protein Data Bank* (Blaber et al., 1996). O refinamento consistiu em uma Dinâmica Molecular (em 300K durante 100 ps após 50 ps de termalização) seguida de minimização de energia até a sua convergência em um gradiente de 0,05 Kcal/mol. Foi empregada constante dielétrica 80 na tentativa de simular o ambiente aquoso.

A Figura 4 (pág. 9) mostra a estrutura obtida.

Para o desenho dos peptídeos relacionados ao Sítio 2 (97-132) [hFGF-1] foram considerados: 1) a estrutura do hFGF-1 (acima citada), 2) os resultados obtidos em estudos do sistema dos FGFs e em investigações via mutagênese sítio dirigida da relação estrutura-função destas proteínas e de seus receptores (FGFRs) (Harper & Lobb 1988; Burgess et al., 1991; Pantoliano et al., 1994, Springer et al., 1994; Thompson et al., 1994; Imamura et al., 1995; Ornitz et al., 1996; Sieber & Moe, 1996; Zhu et al. 1995; 1997); 3) a seqüência primária da proteína e da porção correspondente ao Sítio 2 (Jaye et al., 1986), 4) o conhecimento de que peptídeos lineares apresentam grande flexibilidade conformacional, podendo assumir suas conformações ativas apenas quando interagem com seus receptores celulares (*induced-fit*, Schwizer, 1995); 5) o conhecimento de que peptídeos contendo restrições conformacionais podem ser sintetizados quimicamente, de que estes são menos flexíveis em solução e de que, por isto, pode-se aumentar as suas afinidades e/ou seletividades pelos receptores celulares (Blundell, 1996; Rizo et al., 1996); 6) os dados anteriores obtidos no laboratório com peptídeos sintéticos lineares derivados da mesma região da proteína já citados (Oyama et al., 1996).

A maioria dos peptídeos propostos foi submetida à análise conformacional teórica. Os dados obtidos nos auxiliaram na inclusão ou exclusão de cada composto analisado em uma lista viável de ser obtida por métodos de síntese (**Esquema 1**, pág. 19).

3.2. MODELAGEM MOLECULAR

O procedimento adotado para a modelagem molecular dos peptídeos foi o seguinte: todos eles foram estudados quanto às suas tendências em assumir conformações semelhantes às apresentadas pelos fragmentos da proteína a eles correspondentes quando parte integrante da estrutura da estrutura tridimensional do hFGF-1 (**Figura 4**, pág. 9).

As análises teóricas das conformações foram feitas através da simulação dos movimentos moleculares internos espontâneos dos peptídeos por Dinâmica Molecular (DM; McCammon et al., 1977; Karplus, 1988).

Pelo fato de tratar-se de segmentos de comprimentos comparáveis, foi desenvolvido um protocolo único para estes cálculos, que se constituiu em uma combinação de Dinâmica Molecular de Alta Temperatura (HTMD) para uma rápida, mas efetiva exploração do espaço conformacional seguida por simulação *quasi-annealing* para o relaxamento das estruturas estudadas.

As condições escolhidas para os cálculos de HTMD que permitiram uma exploração significativa do espaço conformacional (Brooks III e col., 1988) encontram-se listadas na **Tabela 2** abaixo:

Temperatura 1	400 K
Tempo de termalização 1	20 ps
Temperatura 2	800 K
Tempo de termalização 2	50 ps
Tempo de simulação	100 ps
Constante dielétrica (ɛ)	80

Tabela 2: Condições escolhidas para as simulações por Dinâmica Molecular em alta temperatura

A constante delétrica (ɛ) da água foi considerada nesses cálculos com o objetivo de aproximar o sistema modelo das condições experimentadas pelas moléculas no meio fisiológico. Este cuidado evita a superestimação das interações que podem ocorrer entre as espécies carregadas das moléculas na fase gasosa (Horwell, 1995).

Para análise da trajetória percorrida dentro do espaço conformacional e obtenção de um conjunto de conformações mais estáveis, foram coletadas amostras de confôrmeros em intervalos regulares. Estas amostras foram conduzidas em direção a geometrias energeticamente mais estáveis através do resfriamento do sistema a uma temperatura intermediária, empregando-se a técnica do *simulated annealing* (Kirkpatrick et al., 1983). As condições estão descritas na **Tabela 3** abaixo :

Tabela 3. Condições escolhidas para o "annealing" as amostras de conformações coletadas.

Temperatura inicial	400 K
Tempo de termalização	5 ps
Tempo de simulação	20 ps

As conseqüências do abaixamento da temperatura de simulação foram as diminuições de energia cinética e, indiretamente também de energia potencial das amostras, tendo esta energia sido minimizada empregando-se os algorítmos de otimização mostradas **Tabela 4** abaixo:

Tabela 4. Condições escolhidas para a minimização final das conformações

Minimizador	Critério de convergência
Steepest descent	dE/dr _i ≤ 0,9 kcal/mol
Conjugated gradient	dE/dr _i ≤ 0,05 kcal/mol

dE/dr_i - desvio da energia em função da coordenada cartesiana espacial i

Estas condições foram também utilizadas para a minimização inicial dos dados geométricos requeridos nas etapas de HTMD e *quasi-annealing* descritas acima.

Nas simulações de dinâmica molecular eram criados os históricos dos movimentos internos espontâneos das moléculas onde eram registradas as coordenadas atômicas dos confôrmeros da molécula estudada a cada pico-segundo. Os históricos obtidos durante as simulações se constituíam, portanto, em registros gráficos de uma sucessão de confôrmeros como função de suas respectivas coordenadas espaciais. Esses históricos possibilitaram a visualização das estruturas de cada confôrmero individualmente e as suas coordenadas atômicas puderam ser comparadas entre si em termos de desvios em RMSD (*root mean square deviation*). Os valores de RMSD assim obtidos possibilitaram o agrupamento de cada uma das estruturas em famílias de conformações. As estruturas representantes de cada família foram submetidas ao resfriamento (*annealing*) e às minimizações de acordo com os métodos acima descritos. Na análise final, todas essas amostras refinadas foram comparadas energética e estruturalmente quanto às suas semelhanças entre si e com o segmento correspondente na molécula nativa com base nos valores de desvios RMS de suas coordenadas espaciais.

As análises teóricas das conformações dos peptídeos (visualização e cálculos) foram feitas em uma estação de trabalho IRIS - INDIGO da Silicon Graphics e em uma estação IBM – RS 6000 3 AT. O programa Insight II v.95 da Molecular Simulations foi utilizado tanto para a parte de cálculos (módulo Discover) quanto para a parte de visualização (módulos Biopolymer e Analysis) e construção por homologia (módulo Homology).

3.3. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Todos os peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida utilizando-se a estratégia t-Boc (Stewart e Young, 1984) conforme o **Esquema 3**.

As sínteses foram iniciadas partindo-se da resina MBHA (grau de substituição 0,69 mmoles/g, escala de 0,5 mmoles ou 0,25 mmoles) à qual os t-Boc aminoácidos da seqüência foram sendo acoplados. Os protetores dos grupos funcionais das cadeias laterais dos Boc-aminoácidos foram: éster benzílico para Asp e Glu, tosil para His e Arg, 2-clorobenziloxicarbonil para Lys, éter benzílico para Ser e Thr e p-metoxibenzil para Cys.

As reações de acoplamento foram realizadas empregando-se 2,5 vezes de excesso molar de t-Boc aminoácido em DCM na presença do reagente acoplador DIC 1M em DCM por 1-2h sob agitação. Após lavagens alternadas com MeOH, TEA 10% em DCM e DCM, os acoplamentos foram monitorados pelo teste de ninidrina (TN; Kaiser et al.,1970). Quando o resultado foi positivo, o mesmo derivado de aminoácido foi reacoplado na presença de HOBt. Em geral, o solvente utilizado nestas reações foi o DCM. Em alguns casos, quando o acoplamento de algum aminoácido não foi total, o reacoplamento foi realizado em uma mistura de DCM:DMF em proporções 1:1 ou 1:2 (v/v) ou em NMP. Os acoplamentos envolvendo Boc-Asn-OH ou Boc-Gln-OH foram realizados sempre em DMF ou em NMP na presença de HOBt.

As desproteções dos Boc-aminoácidos foram feitas com TFA 50%/ DCM durante 20 min, sob agitação, na presença de ~5% de anisol. Estas reações foram também monitoradas pelo teste de ninidrina (positivo quando a desproteção foi eficiente).

A acetilação do grupo alfa-amino terminal das peptidil-resinas foi realizada tratando-as com anidrido acético por 10 min e lavando-as em seguida com MeOH, DCM e TEA 10% em DCM. Esta etapa também foi monitorada pelo teste de ninidrina.

A desproteção total e a clivagem simultânea das peptidil-resinas obtidas foram feitas pelo tratamento com 10 mL de fluoreto de hidrogênio (HF) por 90 min na presença de 10% anisol. Para os peptídeos contendo cisteína, adicionou-se DMS 5% ao meio reacional. Os peptídeos brutos foram precipitados com éter etílico anidro e filtrados juntamente com as resinas. Em seguida, estes foram separados delas por extração com os solventes A (ACN 0,1% em água) e B (ACN 60% /TFA 0,09% em água).

As soluções resultantes foram liofilizadas (peptídeos lineares) ou diluídas com água (peptídeos a serem ciclizados).

Esquema	3: Procedimento Experimental para a	a Síntese de
•	Peptídeos em Fase Sólida	

1. Lavagem inicial	4. Desproteção (retirada de Boc)
. 2x DCM	. Anisol (2 ou 3 gotas)
. 2x MeOH	. TFA/DCM (1:1, v/v)
. 2x TEA 10%/ DCM	. 20 min (sob agitação)
. 2x MeOH	5. Lavagem da desproteção
. 2x DCM	. Anisol (1%)/ Isopropanol
. TN (+)	. 2x MeOH, 2x DCM, 2x TEA 10%/ DCM
2. <u>Acoplamento</u>	. 2x MeOH, 2x DCM, 2x TEA 10%/ DCM
. Boc-aa (2,5x em excesso)	. 2x MeOH
. DIC(1M)/DCM: Boc-aa (1:1)	. 2x DCM
. DCM (ou DCM:DMF-1:1)	. TN (+)
. 1-2h.	6. Acetilação
3. Lavagem pós -acoplamento	. Anidrido acético (10 min)
. 2x MeOH	. 2x MeOH
. 2x DCM	. 2x TEA 10%/DCM
. 2x TEA 10%/ DCM	. 2x DCM
. 2x MeOH	. 2x DCM
. 2x DCM	. TN (-)
. TN (-)	· ·

TN =Teste de ninidrina (Kaiser et al., 1970); + e - = resultados positivo e negativo esperados

3.4. CICLIZAÇÃO

3.4.1. Oxidação de grupos sulfidrilas pelo oxigênio do ar (Esquema 4)

A ciclização foi feita imediatamente após a desproteção total e clivagem da peptidilresina com base em Rivier et al. (1978).

Aos extratos aquosos dos peptídeos brutos foi acrescentada acetonitrila a fim de se obter uma solução 0,2 - 0,3 mM de peptídeo e aproximadamente 10% de solvente orgânico. Os pHs das soluções foram elevados para 8,0 pela adição de NH₄OH 10%. As mesmas foram mantidas à temperatura ambiente, sob agitação suave, por 24 h. A reação de oxidação foi monitorada através da análise por RP-HPLC de alíquotas da solução reacional. Nos casos em que não se observou alteração dos perfis cromatográficos, a temperatura das soluções foi aumentada até 45°C e mantida por 1 a 2 horas.

Uma vez completadas as reações, os pHs das soluções contendo os peptídeos brutos ciclizados foram diminuídos para 4,0 pela adição de solução de ácido acético 10%. As soluções finais foram concentradas a vácuo e liofilizadas.

3.4.2. Oxidação de grupos sulfidrilas com Ferricianeto de Potássio 0,01 M (Esquema 4)

A oxidação foi realizada empregando-se o oxidante ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) segundo Misicka & Hruby (1994).

Os extratos aquosos dos peptídeos brutos (0,2-0,3 mmoles de peptídeo) foram transferidos para balões de três bocas tendo os seus pHs sido elevados para 7,5 - 8,0 com solução de NH₄OH 10%. As soluções reacionais foram mantidas sob fluxo de nitrogênio gasoso para garantir que a oxidação ocorresse apenas pela reação com a solução de K₃Fe(CN)₆ 0,01 M (~50 mL), que foi sendo adicionada gota a gota. Esta adição foi interrompida quando a coloração das soluções reacionais não mais se modificou, mas a reação de oxidação foi continuada por mais 1 hora para garantir que a mesma se completasse. Em seguida, os pHs das soluções reacionais foram abaixados para 4,0 por adição de solução de ácido acético 10%. Da mesma forma que no método descrito ítem 3.4.1 acima, o monitoramento das ciclizações foi feito por RP-HPLC.

3.4.3. Ciclização via lactama (Esquema 4)

Neste caso, a síntese do peptídeo foi precedida pela escolha de dois Boc-aminoácidos cujas cadeias laterais estivessem bloqueadas por grupos protetores apropriados para uma desproteção diferenciada daquela dos demais protetores empregados para os grupos funcionais dos outros resíduos. Desta forma, foram empregados o Boc-Glu(OFmoc)-OH para a incorporação do Glu⁵ e o Boc-Lys(Fmoc)-OH para a incorporação da Lys¹⁴ na síntese do peptídeo VIII, ou ainda, o Boc-Asp(OFmoc)-OH para a incorporação de Asp¹ e Boc-Dbu(Fmoc)-OH para a incorporação de Dbu⁵ na síntese do peptídeo **IX**. O Fmoc é resistente a ácidos e lábil a bases, enquanto que os protetores dos grupos funcionais das cadeias laterais dos outros aminoácidos eram grupos lábeis a ácidos. Após o acoplamento do último resíduo de aminoácido e acetilação de seu grupo amino alfa, a peptidil-resina obtida foi submetida ao tratamento com solução de piperidina 20% em DMF por 15 minutos sem qualquer agitação. Este tratamento foi repetido sob agitação. A peptidil-resina foi então lavada com DMF (2x), MeOH (2x) e com DCM (2x). Testes de ninidrina foram feitos e os resultados foram positivos. Em seguida, foi feita a reação de formação da ligação lactama entre as cadeias laterais desprotegidas de Asp e Lys empregando-se o TBTU como reagente de acoplamento em DMF na presença de DIPEA (algumas gotas até que o pH aparente ficasse ao redor de 9,0. A reação foi interrompida após o resultado do teste de ninidrina ter se mostrado negativo (90 min; Felix et al., 1988). A peptidil-resina ciclizada foi lavada com DMF (2x), MeOH (2x) e com DCM (2x), seca e submetida à desproteção total e clivagem simultânea da resina na presença de HF como descrito acima.



Esquema 4: Representação esquemática das ciclizações dos peptídeos via ligação dissulfeto e via ligação lactama.

3.5. ANÁLISE E PURIFICAÇÃO

Em geral, as análises iniciais dos peptídeos brutos por RP-HPLC foram feitas empregando-se as seguintes condições: colunas analíticas C-18 Vydac (0,46 cm x 25,0 cm, 5 μ m, 300 Å); gradiente linear de 5% a 95% de solvente B em 30 min; fluxo de 1 mL/min; comprimento de onda de 220 nm; solvente A constituído por TFA 0,1% em água; solvente B constituído por ACN 60%/H₂O contendo TFA 0,09% (Mant & Hodges, 1991; Scopes, 1994).

De acordo com os perfis cromatográficos exibidos pelos peptídeos foram determinadas condições mais adequadas e específicas variando-se sistemas de solventes, gradientes e polaridade de colunas. O melhor sistema de solventes (A e B) foi determinado testando-se concentrações variáveis de ACN no solvente B. A substituição da coluna C-18 por outra menos hidrofóbica (como por exemplo, a coluna C-4 do mesmo fabricante) foi feita sempre que as variações nos solventes não era suficiente. As faixas de variação do percentual de solvente B foram desenhadas com base nos tempos de retenção dos peptídeos na coluna. Gradientes lineares com acréscimos de 1% de solvente B por minuto foram empregados.

De posse ds condições analíticas apropriadas, realizamos as purificações dos peptídeos empregando: colunas preparativas Vydac C-18 ou C-4 (2,2 cm x 25,0 cm, 5µm, 300 Å), fluxo de 10 mL/min e comprimento de onda de 220 nm. Os gradientes empregados em tais purificações, assim como as condições isocráticas para as análises das frações obtidas, foram escolhidos previamente com base nas análises específicas dos peptídeos brutos. Os percentuais de acréscimos de solvente B por minuto foram de 0,33% ou 0,5%B/min.

De uma maneira geral, os peptídeos foram analisados e purificados empregando-se preferencialmente o sistema de solventes contendo o TFA como par iônico: 0,1% TFA (solvente A) e 60% ACN/0,09% TFA (solvente B). Entretanto, nos casos em que os peptídeos brutos apresentaram contaminantes com tempos de retenção muito próximos procedeu-se a purificação em duas etapas. Inicialmente, foi empregado o sistema de solventes constituído por solução de TEAP (H₃PO₄ 6,36 mL/L e TEA 7,73 mL/L em H₂O, pH 2,05) como solvente A e ACN 60% /TEAP como solvente B para a separação de todos os componentes presentes no peptídeo bruto em diferentes frações (Sistema 1). Em seguida, cada uma dessas frações foram submetidas à dessalinização empregando-se o sistema contendo TFA acima descrito (Sistema 2). Foram feitos cortes e coletas manuais, o que garante uma purificação mais controlada e eficiente. O **Esquema 5** resume o procedimento geral adotado para as purificações dos peptídeos.

As análises e as purificações dos peptídeos sintéticos por RP-HPLC foram realizados nos seguintes instrumentos: a) LDC Analytical, sistema de bombeamento de solvente modelos 3200 e 3500, detector espectrofotométrico modelo 3100, injetor Rheodyne 7161 e integrador Data Jet da Thermo Separation Products; b) Beckman System Gold, sistema de bombeamento de solvente modelo 126, detector espectrofotométrico modelo 166 e integrador marca Waters, módulo 745 B. O comprimento de onda escolhido para a detecção da absorção das ligações peptídicas foi de 210 ou 220 nm.

Esquema 5: Seqüência de passos para a purificação/separação de peptídeos e contaminantes por RP-HPLC.



3.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Os peptídeos obtidos foram caracterizados por:

3.6.1. RP-HPLC de fase reversa analítica

A determinação do grau de pureza dos peptídeos purificados foi feita em coluna analítica (Vydac C4 ou C18: 5 μm, 300 Å; 0,46 x 25 cm) nos dois sistemas de solventes (TEAP e TFA) acima descritos, empregando-se gradientes formados pela variação do percentual de solvente B de 1%/min, fluxo de 1mL/min e detecção em 210 ou 220 nm.

3.6.2. Hidrólise total e análise de aminoácidos

Os peptídeos e os contaminantes purificados foram submetidos à hidrólise ácida gasosa com HCI 6N, em presença de cristais de fenol e sob atmosfera de N₂, a 110°C por 24 horas em uma estação de trabalho PicoTag da Waters (Roach & Gehrke, 1970). A composição molar dos aminoácidos presentes nos peptídeos foi determinada em um analisador automático da Beckman Instruments, Inc (modelo 7300) que emprega o método de derivatização póscoluna, no qual os aminoácidos são separados por cromatografia de troca iônica e detectados a 440 ou 570 nm como produtos da reação com ninidrina. A proporção molar de cada resíduo de aminoácido foi determinada em relação à concentração molar total dos resíduos de aminoácidos detectados por este método (Moore & Stein, 1963).

3.6.3. Espectrometria de massa

As massas moleculares dos peptídeos e dos contaminantes purificados foram determinadas em espectrômetros de massas do tipo *Matrix Assisted Light Desorption Ionization* - *Time of Flight - Mass Spectrometer* (MALDI-TOF-MS) e por *Eletron Spray Ionization - Mass Spectrometer* (ES-MS) (Siuzdak, 1996). As análises foram realizadas nos laboratórios do Dr. Kouki Kitagawa, Niigata College of Pharmacy, Niigata, Japão e do Dr. Massuo Kato deste Instituto, respectivamente.

3.7. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

3.7.1. Atividade mitogênica

A atividade mitogênica dos peptídeos sintéticos foi determinada pela medida da incorporação de timidina triciada (metil ³H-timidina) no DNA de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3 provenientes do clone A31 conforme o método descrito por Armelin (1973) e adaptado de Oyama e colaboradores (1996).

Os fibroblastos de camundongos Balb/c, 3T3, clone A-31 eram mantidos congelados a -70°C em alíquotas de suspensão celular (~1x10⁶ células/mL em DMEM contendo 5% DMSO). Antes de se iniciar os ensaios de atividade mitogênica propriamente ditos, cada alíquota era descongelada e cultivada em garrafas contendo DMEM enriquecido com 10% de soro bovino fetal (DMEM/10%FCS). As células assim cultivadas eram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ para a multiplicação das mesmas até a obtenção de um número de céulas suficiente para a realização dos ensaios. Em nossos ensaios, a suspensão de fibroblastos A-31 eram adicionadas às placas contendo 24 poços e cultivadas até atingirem a sub-confluência (tempo -

48h do ensaio, **Esquema 6**). Este procedimento permitia controlar o número de células contidas em cada poço, visto que as mesmas crescem aderidas ao fundo desses poços. Ao se carenciar as células sub-confluentes por 48 horas em meio de cultura contendo baixa concentração de soro (DMEM/1%FCS), tentava-se sincronizar as células na fase G₀/G₁ do ciclo celular no momento da adição dos indutores de síntese de DNA (tempo zero do ensaio, **Esquema 6**). Neste ponto, o meio de carenciamento era trocado por outro isento de soro (DMEM) e acrescido de **insulina 5 mg/mL**, que mantém a adesão e a viabilidade das células até o final de ensaio.

A timidina triciada era adicionada à cultura de fibroblastos (concentração final/poço de 0,5 μCi/mL ou 2x10⁻⁶ M) no momento em que os fibroblastos iniciam a entrada para a fase de síntese de DNA do seu ciclo celular, ou seja, após cerca de 12 horas de tratamento com os indutores (tempo 12h, **Esquema 6**). As células eram incubadas por mais 12 h (tempo 24 h, **Esquema 6**) para permitir que as mesmas completassem essa fase e, durante esse período, ocorresse incorporação da timidina radioativa em seus DNAs. Antes que as células iniciassem a fase seguinte de divisão celular (ou mitose), o processo era interrompido através do tratamento das células e precipitação dos seus DNAs com TCA 5% gelado. A solubilização destes era feita pela adição de NaOH 0,5 N. Os materiais solubilizados eram absorvidos por papéis de filtro que, após lavagens com etanol e acetona, eram secos a 45°C e colocados em frascos contendo líquido de cintilação. A radioatividade impregnada nesses papéis de filtro era contada em um contador de radiações beta (Hewlett Packard).

⇒ Pré-incubação de peptídeos com FGF-1 ou FGF-2: Os peptídeos que possuem seqüências derivadas do domínio III do receptor FGFR-1 β (peptídeos XVIII e XIX) foram préincubados com FGF-1 humano recombinante (2 ng/mL) ou FGF-2 humano recombinante (2 ng/mL) a 37°C por 15 min, antes da adição das misturas à cultura de fibroblastos carenciados em sub-confluência (tempo 0 h do ensaio, **Esquema 6**) segundo o protocolo descrito por Oyama e colaboradores (1999).



Esquema 6: Protocolo de determinação da atividade mitogênica dos peptídeos em cultura de células.

- -48 h Carenciamento de células sub-confluentes em meio contendo 1% FCS.
- 0 h Troca de meio de cultura por outro contendo insulina 5 μg/mL. Adição de peptídeos diluídos em PBS contendo 1 mg/mL BSA em diferentes concentrações, e de controles: PBS (negativo), FCS 10% (positivo; 100% R).
- 12 h Adição de timidina triciada.
- 24 h Precipitação do DNA das células e contagem da radioatividade incorporada nele.

As determinações em cada experimento foram realizadas em duplicata e os controles utilizados nesses ensaios foram os seguintes:

⇒ PBS - para quantificar a incorporação de timidina triciada no DNA dos fibroblastos na ausência de fator de crescimento. A contagem de radioatividade (cpm PBS ou 0%R) obtida pela adição de PBS à cultura de células foi subtraída de todos os outros pontos.

⇒ FCS 10% - A contagem de radioatividade (cpm) obtida com a adição de FCS 10% à cultura de células (cpm FCS10%) foi subtraída daquela obtida com PBS. Esta diferença reflete a capacidade máxima de indução de iniciação da síntese de DNA nos fibroblastos (cpm FCS 10% - cpm PBS ou 100% R).

 \Rightarrow **FGF-1** (1 a 5 ng/mL) - foi usado como controle da capacidade das células de serem induzidas à síntese de DNA e, ao mesmo tempo, como controle da potência do FGF-1 sobre as mesmas.

⇒ HEP 10 mg/mL - usada para determinação de sua capacidade de potenciar a atividade mitogênica dos peptídeos pela adição simultânea destes à cultura de fibroblastos.

 \Rightarrow HEP + FGF-1 - foi usado como controle de sua capacidade de potenciar a atividade mitogênica do FGF-1.

A resposta mitogênica (% R) de uma dada amostra (no nosso caso, diferentes concentrações de peptídeo sintético) foi calculada da seguinte forma:

% R =
$$(cpm peptideo - cpm PBS) \times 100$$

(cpm FCS 10% - cpm PBS)

Os dados de atividade mitogênica foram obtidos através da repetição dos ensaios com o mesmo grupo de peptídeos e com os controles acima mencionados por um número expressivo de vêzes (3 - 10). Os resultados obtidos nessas repetições dos ensaios foram analisados separadamente, sem cálculos estatísticos do grau de dispersão de cada ponto. A análise do conjunto de experimentos forneceu uma tendência de comportamento de um determinado peptídeo quanto à sua atividade quando adicionado à cultura de fibroblastos. O comportamento exibido pelo peptídeo foi representado graficamente, tomando-se apenas um experimento representativo do conjunto de testes e que reproduz a tendência observada. A análise estatística não foi realizada devido à alta variabilidade observada neste tipo de ensaio biológico. Este procedimento é normalmente adotado pela maioria dos pesquisadores que realizam determinações das atividades mitogênicas dos diversos fatores de crescimento e de peptídeos sintéticos a eles relacionados (Baird et al., 1988; Ornitz et al., 1996; Ray et al., 1997).

3.7.2. Marcação dos hFGF-1 e hFGF-2 com ¹²⁵I

Os FGF-1 e FGF-2 humanos recombinantes foram iodinados pelo método da cloramina-T descrito por Kan e colaboradores (1991).

Sumarizando, 25µg da proteína foram iodinados com Na¹²⁵I (10 mCi, atividade específica >350 mCi/mL, Amersham, Arlington Heights, IL), em tampão fosfato (TF 25 mM, pH 7,0 e 30 µL de cloramina-T (4 mg/ml em TF 250 mM, pH 7,0) à temperatura ambiente durante

90 s com agitação. A reação foi interrompida pela adição de 250 μ L de DTT 25 mM em TF 25 mM, pH 7,0. O ¹²⁵I incorporado pela molécula de FGF-1 foi quantificado por precipitação desta proteína marcada com TCA 50% gelado. Para remover o ¹²⁵I livre, a mistura de reação foi aplicada em uma coluna de HEP-Sepharose CL-6B (200 μ L de volume de resina). Após lavagem com 10 mL de solução de 0,5 M de NaCI em TF 25 mM, pH 7,0, o FGF marcado foi eluído com 2 x 1,0 mL de NaCI 2M em TF 25 mM, pH 7,0.

A dose sub-saturante da proteína marcada com ¹²⁵I foi determinada em fibroblastos de camundongos A31 sub-confluentes, que foram cultivadas em placas contendo 24 poços. As células de cada poço foram lavadas por duas vezes com PBS gelado e por uma vez com tampão de ligação (HEPES 25mM acrescido de BSA 1 mg/ml em DMEM, pH 7,0). Estas foram incubadas a 4°C por 10 min. Em seguida, em 250 µL da mesma solução tampão colocados em cada poço, foram adicionadas diferentes quantidades da proteína marcada (¹²⁵I-FGF-1 ou ¹²⁵I-FGF-1) e uma quantidade fixa contendo um grande excesso de proteína não marcada (FGF-1 frio, 2 µg/mL ou FGF-2 frio, 2 µg/mL). As placas foram então incubadas a 4°C por 2,5 h com agitação ocasional. Após este período de incubação, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e uma vez com o tampão de ligação. Em seguida, as mesmas foram suspensas com 400 µL de Triton X-100 1% e transferidas para tubos onde foram feitas as medidas de radioatividade foi medida em um contador de radiações gama (Beckman).

3.7.3. Ensaio de ligação entre o peptídeo e o receptor celular

Este ensaio foi feito conforme o protocolo acima descrito (Kan et al., 1991), empregando-se os fibroblastos de camundongos, clone A31, também sub-confluentes. Estes foram tratados com concentrações variáveis de peptídeos sintéticos e uma dose sub-saturante da proteína marcada com Na¹²⁵I.

3.7.4. Incorporação de bromo deoxiuridina (BrdU) em células tratadas com peptídeos sintéticos

Este método possibilita a visualização da entrada das células para a fase S do seu ciclo celular, por imunofluorescência indireta, quando as mesmas são estimuladas por mitógenos. O mesmo permite a quantificação exata da atividade desses mitógenos. Estes ensaios foram feitos utilizando-se o protocolo elaborado pela Dra. Claudimara Lotfi (Armelin et al., 1996) que se segue: Fibroblastos de camundongos pertencentes ao clone A-31 foram plaqueados em lamínulas circulares contidas em uma placa de Petri (P60) de forma a obter cerca de 15000 células/lamínula/40 μ L de DMEM contendo 10% de FCS. As células foram deixadas em repouso por 15 min à temperatura ambiente para que aderissem. Em seguida, foram acrescentados 5 ml de DMEM contendo 10% FCS em cada placa e estas foram incubadas a 37°C em atmosfera com CO₂ 5% até que atingissem a semi-confluência. As lamínulas contendo as células aderidas e semi-confluentes foram lavadas com PBS e com DMEM, sendo as lamínulas então transferidas para outras placas a fim de garantir que todo o soro fosse removido. As células foram carenciadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ por 48 h em DMEM contendo 1% FCS. Após o carenciamento, as células foram novamente lavadas e o meio foi trocado por 1 mL de DMEM contendo insulina (5 μ g/ml). As diferentes amostras de

peptídeos (200 µg/ml) e os controles (PBS, FGF-1 2,5 ng/ml e FCS 10%) foram então adicionados. Após 12 h do ínicio deste tratamento, foram adicionados 10 µL de uma solução 10 mM de BrdU (Sigma, concentração final 100 nM) e as células foram incubadas por mais 12 h. O BrDU é um análogo da timidina que é seletivamente incorporado no DNA durante a fase de síntese. A incorporação deste pelo DNA dos fibroblastos aderidos às lamínulas foi quantificada após o procedimento de imuno-reação abaixo descrito:

- 1. lavagem das lamínulas com PBS (1x) e adição de MeOH gelado por 10 min.
- 2. lavagem com PBS (3x) e reidratação por 15 min.
- 3. adição de 2 mL de HCI 1,5 M em cada poço e incubação por 30 min com agitação branda.
- 4. lavagem com PBSA (PBS isento de Ca^{2+} ou Mg^{2+}) (3x).
- cada lamínula é invertida sobre uma superfície esticada de parafilme contendo 40 μL de anticorpo anti-BrdU (Sigma, 1:50 em PBSA) e deixadas à temperatura ambiente por 30 min.
- 6. retorno das lamínulas às placas contendo PBSA e lavagem com o mesmo tampão (3x).
- novamente, inversão de cada lamínula sobre uma superfície esticada de parafilme contendo 40 μL do segundo anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (IgG-FITC, *Fab specific*, Sigma; 1:50) e repouso no escuro à temperatura ambiente por mais 30 min.
- repetição dos procedimentos anteriores de lavagem com PBSA e inversão das lamínulas sôbre 40-50 μL de DAPI 5 μg/ml e reação por 20min.
- lavagem final com PBSA (3x) e montagem das lamínulas sobre lâminas contendo uma gota de óleo mineral (Nujol) para serem analisadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Fluophot, filtros de excitação: IF 420-490 para IgG-FITC e UV 330-380 para DAPI). As lâminas foram mantidas no escuro, em geladeira, até o momento da análise.

3.7.5. Ensaio de ligação do peptídeo sintético àheparina: Cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose CL-6B

Soluções dos peptídeos purificados (1mg/mL) foram aplicadas em uma coluna preenchida com heparina-Sepharose (Pharmacia LKB Biotech. AB, Upsala, Sweden; 1,0 mL de volume de resina inchada) equilibrada previamente com uma solução 0,1 M de NaCI em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,2. O fluxo empregado de aproximadamente 0,5 mL/min foi mantido com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia LKB). Os peptídeos foram eluídos através de um gradiente linear formado por 5 mL de NaCI 0,1 M em TF 10 mM, pH 7,2 e 5 mL de NaCI1 M/TF 10 mM de mesmo pH. Foram coletadas frações de 1 mL e estas foram analisadas por RP-HPLC, utilizando-se colunas analíticas, nas condições experimentais previamente determinadas para cada peptídeo conforme descrito no item 3.5. desta seção. Paralelamente, com o auxílio de um refratômetro, foram feitas medidas do índice de refração das frações que continham o peptídeo (Shing et al., 1984).

A correlação entre concentração de NaCl que eluía o peptídeo da resina e o índice de refração observado para cada fração do eluído foi determinada através de uma curva padrão. Essa curva foi construída medindo-se os índices de refração das frações (1,0 mL) eluídas da coluna de HEP-Sepharose onde foi passado o mesmo gradiente de NaCl (0,1-1,0 M/TF 10 mM, pH-7,2), num fluxo de 0,5 ml/min sem a aplicação de solução de peptídeo. A variação da concentração de NaCl no gradiente aplicado na coluna foi de 0,09 M/min.mL.

A solução de tampão fosfato de sódio utilizada neste experimento era constituída por 10 mM de NaH₂PO₄ e o seu pH foi acertado para 7,2 com uma solução de NaOH 0,5N.

Os dados assim obtidos foram tratados matematicamente pelo programa Origin vs.3.5 e forneceram uma curva padrão com valores de desvio padrão que foram utilizados para os cálculos da concentração de NaCl que elui o petídeo da coluna.

3.8. ANÁLISE ESTRUTURAL DE PEPTÍDEOS EM SOLUÇÃO ATRAVÉS DE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.8.1. Espectroscopia de fluorescência

Os peptídeos foram dissolvidos em água bidestilada e deionizada (coluna Milli-Q; Millipore) de modo a resultar em uma solução de aproximadamente 10⁻⁸ M. Seus espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Hitachi - U2000 na região do UV/Vis (200-400 nm) acoplado a um microcomputador Asa 386. A emissão de fluorescência do estado estacionário (*steady state fluorescence emission*) do resíduo de triptofano presente em suas estruturas foi medida em um espectrofluorímetro SPEX DM 3000 F, empregando-se aberturas de fendas de 0,8 mm e 1,0 mm (para entrada da luz excitante) e de 2,5 mm e 2,5 mm (para saída da luz emitida).

3.8.2. Dicroísmo circular

Alíquotas das soluções-estoque dos peptídeos (0,1 M em solução tampão fosfato 5 mM, pH 6,4) foram diluídas com solução TF 5 mM até a concentração final de 0.01M e os seus espectros de dicroísmo circular foram registrados em função: a) da concentração de peptídeo, b) do pH, c) da temperatura, d) da presença de concentrações variáveis de co-solventes (MeOH e TFE) e de soluções de SDS. A faixa de comprimento de onda varrida foi de 190 a 260 nm. As curvas são expressas em elipticidade molar média por resíduo de aminoácido $[\theta]_{\lambda}x10^{-3}$ (deg.cm².dmol⁻¹). As medidas de dicroísmo circular dos peptídeos foram feitas em um espectropolarímetro Jasco J715 acoplado a um computador e uma unidade de controle de temperatura do tipo Peltier, no laboratório do Dr. Alberto Spisni, Universidade de Parma, Parma, Itália.

3.8.3. Ressonância magnética nuclear protônica (¹H-RMN)

Peptídeo Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH2 (I)

Inicialmente, 4 mg de peptídeo foram dissolvidos em H₂O, pH 5,2. A solução obtida foi submetida a um campo magnético de 300 MHz e seus espectros foram registrados em diferentes temperaturas (25°C, 20°C,15°C e 5°C), utilizando-se duas seqüências de pulsos diferentes de RMN. Experimentos semelhantes foram feitos empregando-se também um campo magnético de 500 MHz. Em seguida, foram obtidos novos espectros em soluções aquosas de peptídeo acrescidas de 150 mM de KCI e 50mM de KH₂PO₄, pH 6,0 a 25°C. Finalmente, outros 4 mg de peptídeo I foram dissolvidos em 500 µL de H₂0 contendo 10% D₂O (aproximadamente 4 mM). Massa de KCI necessários para uma concentração de 150 mM foi adicionada a esta solução de e o pH foi acertado para 5,2. Essa amostra foi submetida à

análise por: 1) espectroscopia unidimensional (1-D ¹H-RMN); 2) espectroscopia bidimensional (2-D ¹H-RMN): NOESY, TOCSY, COSY, ROESY e DQF-COSY.

Os espectros de RMN do peptídeo I foram obtidos em espectrômetros de ressonância Bruker de 300 e 500 MHz no laboratório do Dr. Brian D. Sykes, Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá.

Peptideos Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (III), c(1-5) [Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] (IV) e Ac-NTTDEKENVLH-NH₂ (XVIII)

Os peptídeos foram dissolvidos em uma mistura de solução tampão fosfato, pH 6.0 em CD₃OH, 1:1, v/v para dar uma concentração final de 4 mM. Essas soluções foram submetidas aos experimentos bidimensionais do tipo DQF-COSY, *clean*-TOCSY (*mixing times* 15 e 80 ms), ROESY (*mixing time* 300 ms) e NOESY (*mixing time* 200 ms) e registrados através de técnicas padrões. Esses experimentos de ¹H-NMR foram feitos a 25°C em espectrômetros Bruker AMX and DMX que possuem freqüências de operação de ¹H de 400,13 MHz e 499,87 MHz, respectivamente.

Determinação das estruturas de III, IV e XVIII

As estruturas tridimensionais destes peptídeos foram determinadas em uma estação de trabalho Silicon Graphics Indigo empregando-se os algoritmos de *distance geometry* e de minimização da DISCOVER. O campo de força empregado foi o cvff *(constant valence force field*) (MSI, San Diego, CA) com imposição das restrições de distâncias de ligações e ângulos diedros ϕ derivadas dos experimentos de RMN. A qualidade das estruturas finais foi verificada com base nos valores mínimos de violações das distâncias NOE<0.3 Å), assim como das violações dos ângulos diedros ϕ (< 5 graus).

As análises dos peptídeos **III**, **IV** e **XVIII** por RMN e a determinação de suas estruturas foram também realizadas no laboratório do Dr. Alberto Spisni, Universidade de Parma, Parma, Itália.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já citado no item Proposição, uma vez que o segmento NWFVGL era comum aos peptídeos mitogênicos sintetizados anteriormente no laboratório Oyama et al., 1996) e que o GLKKN estava contido no peptídeo inativo Ac-GLKKNGSSKRGPRT-NH₂, decidimos:

- a) ressintetizar, purificar, caracterizar química e biologicamente e realizar uma análise estrutural parcial do melhor agonista peptídico encontrado até então, o Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ (I);
- b) desenhar, obter e testar novos peptídeos lineares relacionados às seqüências imediatamente adjacentes ao segmento WFV na região 2 da proteína (Figura 7);
- c) desenhar, obter e testar análogos de conformação restrita destes novos peptídeos lineares: peptídeos cíclicos derivados dos FGFs com atividades agonistas ao destas proteínas nunca foram sido descritos.

Assim, foram desenhados os três grupos de compostos a serem estudados (**Tabela** 1):

<u>Grupo 1</u>: constituído por **II** a **IX** que correspondem a fragmentos da proteína nativa e que, sob o ponto de vista teórico, poderiam assumir conformações semelhantes àquelas assumidas por eles quando ainda na proteína.

<u>Grupo 2</u> constituído por X a XV que constituem um grupo de análogos do peptídeo I. O peptídeo X apresenta deleção de um resíduo de lisina em sua estrutura, enquanto os outros (XI-XV) apresentam modificações estruturais, tais como substituição do segmento KKNGS por uma prolina e/ou deleção GPRT e ciclização via ligação dissulfeto. Estes peptídeos foram desenhados com a finalidade de: 1) determinar os requisitos estruturais para a atividade mitogênica do peptídeo I; 2) encontrar análogos mais ativos ou ainda com efeito antagônico ou inibitório do FGF-1 humano.

<u>Grupo 3</u>: constituído pelos peptídeos VIII, IX, XVI e XVII que foram desenhados com base nos dados experimentais obtidos com os peptídeos citados acima, sendo: 1) VIII e IX, análogos de IV que contém uma ligação lactama mais estável do que a ponte dissulfeto existente; 2) XVI e XVII, análogos do peptídeo I que apresentam mutação das lisinas 112 e 113 por alanina. Tais peptídeos poderiam fornecer informações adicionais valiosas sobre os determinantes estruturais de atividade mitogênica nos peptídeos derivados dessa região da proteína ou ainda se comportarem como agonistas mais potentes ou estáveis da mesma.

100 **Y I S K K H A E K N W F V G L K K N G S C K R G P R T** H Y G Q K A I L F

Figura 7: Seqüência primária da região 2 do FGF-1 segundo Jaye et al., 1986.

4.1. ESTUDO CONFORMACIONAL DO PEPTÍDEO AC-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH2 (I)

4.1.1. Análise conformacional teórica

Simulações das propriedades dinâmicas do peptídeo Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ por modelagem molecular foram feitas no sentido de tentar explicar a baixa atividade mitogênica exibida pelo mesmo em comparação com a do hFGF-1. A **Figura 8** mostra as estruturas que representam as famílias de conformações adotadas pelo peptídeo na simulação de Dinâmica Molecular em alta temperatura por 100 ps a 800K . Essa figura mostra que o peptídeo linear apresentou um comportamento randômico, não exibindo preferência por nenhuma conformação definada estável. Estes resultados sugeriram que a baixa atividade mitogênica exibida pelo peptídeo poderia estar relacionada com a sua alta flexibilidade conformacional em solução.



Figura 8: Estruturas representantes das familias de conformações teóricas assumidas pelo peptídeo Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ e obtidas em simulações de Dinâmica Molecular a 800K por 100 ps seguidas de resfriamento e minimização.

4.1.2. Análise conformacional em solução

Para comprovarmos experimentalmente esse comportamento randômico, este peptídeo foi submetido a uma análise conformacional por ¹H-RMN no laboratório do Dr. Brian Sykes, University of Alberta, Canadá.

Como descrito em Materiais e Métodos, vários espectros de ¹H-RMN foram obtidos em diferentes condições experimentais. Em <u>H₂O pura em diferentes temperaturas</u> (5, 15, 20 e 25°C): os espectros eram bem resolvidos, mas indicativos de pouca estruturação. Foram observadas algumas variações dos deslocamentos químicos dos prótons NH e diminuição da velocidade de troca destes prótons em função da temperatura. Também foi observada a presença de pequenos picos em 8,6 ppm a 25°C que tiveram as suas intensidades aumentadas quando a temperatura foi diminuída. Em <u>10% D₂0/H₂0 contendo 150 mM de KCI e 50 mM de KH₂PO₄ em pH 6,0: neste caso, ocorreu grande mudança no espectro obtido. Estas poderiam sugerir uma mudança conformacional do peptídeo ou ainda agregação, já que o</u>

peptídeo se mostrou menos solúvel nestas condições. Tais resultados preliminares demandavam novos espectros. Entretanto, em uma das etapas de mudanças das condições experimentais (de pH da solução e na dessalinização do peptídeo), este foi acidentalmente degradado. Enviamos, então, outros 4 mg de peptídeo purificado a serem analisados.

Espectros unidimensionais e bidimensionais em 300 e 500 MHz foram então obtidos. A **Figura 9** mostra parte do espectro unidimensional do peptídeo, onde se observa apenas os picos dos prótons dos anéis aromáticos e os amídicos. O espectro de DQCOSY da **Figura 10** mostra os picos e a sua atribuição para todos os prótons amídicos dos resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo, com exceção daquele do Asn⁸. Este só foi detectado quando houve expansão do espectro na região de menor campo (3,7-4,8 ppm) e no sentido vertical dos picos (**Figura 11**). Nestas figuras, não se observa pico correspondente à Pro¹⁵, pois quando ligada a mesma não possui próton amídico. Por outro lado, pode-se observar a presença dos picos A, B e C que poderiam ser atribuídos a possíveis impurezas do peptídeo (mesmo que apresentasse pureza superior a 95%), a prováveis conformações adotadas por ele devido à isomerização cis-trans da ligação Gly-Pro ou ainda a presença de conformações variadas.

Valores de deslocamentos químicos obtidos em espectros de RMN podem ser utilizados para a determinação de estrutura secundária de peptídeos e proteínas. Assim, os deslocamentos químicos dos prótons NH e CH do peptídeo I foram determinados (Figura 12) e comparados com aqueles tabelados para NH e CH de peptídeos e proteínas conhecidos em random coils (Wishart & Sykes, 1994) (Figura 13). Na Figura 13 estão mostrados dois gráficos. Um deles mostra as diferenças obtidas versus a seqüência peptídica (δobs-δrc x seqüência). As positivas correspondem a deslocamentos de campo baixo e a estruturas β , enquanto que as diferenças negativas correspondem a deslocamentos de campo alto e a estruturas ahelicoidais. O outro gráfico apresentado na Figura 13 mostra os índices de deslocamento químicos que foram atribuídos aos resíduos de aminoácidos do peptídeo com base nos valores de deslocamentos químicos encontrados em tabelas descritas na literatura (Wishart et al., 1992). O índice 1 corresponde a valores de deslocamentos químicos acima da faixa esperada nas tabelas; o índice zero corresponde a valores de deslocamentos químicos que estão dentro da faixa das tabelas e, finalmente, o índice -1 corresponde a deslocamentos químicos inferiores aos valores mínimos da faixa das tabelas). Grupos de quatro ou mais prótons com índices iguais a -1 indicam prótons alfa em estruturas helicoidais; três ou mais prótons com índices iguais a +1 indicam possíveis estruturas β . Todas as outras regiões são designadas como *coil*s. Ambos os gráficos indicaram, portanto, que quando em solução aquosa o peptídeo I assume um comportamento estrutural bastante aleatório (random coil) (Wishart et al., 1995). Estes estudos e a interpretação dos resultados obtidos foram feitos no laboratório do Dr. Sykes, tendo sido bastante úteis para comprovar a grande flexibilidade do peptídeo analisado em solução aquosa salina (a mesma empregada para os testes de atividade mitogênica).



Figura 9: Região 6-9 ppm do espectro unidimensional (1D-[!]H-RMN) do peptídeo I. Condições experimentais:~4 mM de peptídeo em 10%D₂O/H₂O contendo 150 mM de KCI, pH 5,2, 300MHz.



Figura 10: Região 3,7-4,6 ppm do espectro bidimensional (2D ¹H-RMN- DQCOSY) do peptídeo I. Condições experimentais: ~4 mM do peptídeo em 10% D₂O/H₂O contendo 150 mM de KCI, pH 5,2; 500MHz .



Figura 11: Região 3,7-4,8 ppm do espectro bidimensional (2D¹H-RMN -DQCOSY) do peptídeo I expandida Condições experimentais: ~4 mM do peptídeo em 10% D₂O/H₂O contendo 150 mM de KCI, pH 5,2; 500MHz.



Figura 12: Espectro bidimensional expandido de DQCOSY peptídeo I. Condições experimentais:~4 mM do peptídeo em 10% D₂O/H₂O contendo 150 mM de KCI, pH 5,2; 500MHz (2D¹H-RMN -DQCOSY).

Aminoácido	NH	CH	CH rc	CH - CHrc	IDQ
W Trp 1	8,07	4,51	4,66	-0,15	-1
F Phe 2	7,72	4,46	4,63	-0,17	-1
V Val 3	7,83	3,90	4,12	-0,22	0
G Gly 4	8,03	3,88	3,96	-0,08	-1
L Leu 5	7,93	4,29	4,32	-0,03	1
K Lys 6	8,32	4,38	4,33	0,05	0
K Lys 7	8,83	4,33	4,33	0,00	0
N Asn 8	8,47	4,71	4,74	-0,03	0
G Gly 9	8,39	4,02	3,96	0,06	0
S Ser 10	8,25	4,50	4,47	0,03	0
S Ser 11	8,37	4,47	4,47	0,00	0
K Lys 12	8,32	4,27	4,33	-0,06	0
R Arg 13	8,29	4,28	4,35	-0,07	0
G Gly 14	8,26	4,10	3,96	0,14	1
R Arg 16	8,55	4,38	4,35	0,03	0
T Thr 17	8,04	4,31	4,35	-0,04	0





Figura 13: Análise dos resultados mostrados nas Figuras 9-12. A = Tabela dos valores de deslocamentos químicos (ppm) dos prótons NH e CH de cada um dos resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo I obtidos dos espectros 2D-¹H-RMN, em comparação com os deslocamentos químicos encontrados para prótons CH presentes nos aminoácidos de proteínas em conformação aleatória (rc = random coil). B = Gráfico da diferença de deslocamento químico entre CH e CHrc de cada um dos resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo I. C = Gráfico dos índices de deslocamento químico calculados a partir da tabela de Wishart (1992).

В

С

A

4.2. DESENHO E MODELAGEM MOLECULAR

4.2.1. Peptídeos derivados da região 2 do hFGF-1

Como descrito na seção de Materiais e Métodos, o desenho de novos peptídeos se baseou na estrutura tridimensional do FGF-1 (**Figura 4**; pág.9), em nossos conhecimentos sobre a química e propriedades estruturais de peptídeos, no conhecimento prévio de que a Região 2 era importante para a ligação/especificidade dos FGFs aos FGFRs, em diversos dados da literatura e naqueles obtidos com o peptídeo **I**.

A observação da seqüência ¹⁰⁶NWFVGLKK¹¹² na estrutura tridimensional do FGF-1 nos revelou que as cadeias laterais dos resíduos K100, K101, E104, K105, N106, W107 e F108 que formam uma alça dupla, estavam mais expostas ao solvente (**Figura 14**). Por outro lado, os resíduos imediatamente posteriores à F108 encontravam-se mais enterrados na molécula, estando as suas cadeias laterais pouco acessíveis ao solvente. Continuando ao longo da seqüência em direção à extremidade C-terminal, já em uma face da molécula distinta de onde se encontra a alça dupla citada acima e onde começa o suposto sítio de ligação à heparina, as cadeias laterais das lisinas K112 e K113 também mostravam-se mais expostas.



Figura 14: Alça que corresponde ao loop 3 na estrutura do FGF-1 proposta por Murzin et al. 1992.

As seqüências primárias dos peptídeos propostos incluem alguns destes resíduos de aminoácidos cujas cadeias laterais mostraram estar acessíveis ao solvente uma vez que estes poderiam se consistir em possíveis epitopos de ligação dos FGFs aos receptores celulares.

Os peptídeos foram concebidos com os seus grupos N- e C-terminais acetilados e amidados, respectivamente, de modo a se evitar qualquer influência de cargas sobre a conformação. A amidação visava também a proteção dos peptídeos de eventual degradação por carboxipetidases durante os ensaios biológicos.

As possibilidades de deleções e/ou substituições de resíduos de aminoácidos foram também estudadas com vistas a determinar a importância destes na expressão de determinados resíduos na atividade mitogênica ou na capacidade de inibição da atividade mitogênica da proteína íntegra.

Na molécula do hFGF-1, o segmento ¹¹²KKNGS¹¹⁶ constitui o final de um grupo ou *hairpin* localizado em uma face distinta e relativamente afastada daquela que compreende os resíduos 106-112 cujas cadeias laterais mostraram estar expostas ao solvente. Por essa razão, resolvemos pela substituição deste segmento por um resíduo de prolina que possui um tamanho compatível com o seu encaixe na região de *b-turn* da estrutura original. Esta substituição foi feita com o intuito de diminuir o tamanho do anel de cada peptídeo cíclico.

O segmento ¹²⁰GPRT¹²³ constitui uma alça (*loop*) que se inicia a partir dos resíduos de G120 e P121. Este par constitui-se em um código de *loop* que parece ter apenas a função estrutural de conectar as duas fitas β antiparalelas que constituem o sítio 2 do FGF-1. Por esta razão, em alguns dos peptídeos desenhados, este segmento foi subtraído para que levasse assim a uma diminuição do tamanho das seqüências adjacentes aos ciclos.

É importante salientar que durante todo esse processo, o objetivo primordial foi o de "reproduzir conformacionalmente segmentos da região 2 no FGF-1". Pelo fato de tratar-se de análogos, os peptídeos desenhados não tem exatamente a mesma seqüência primária do FGF-1.

Também foram feitas medidas da distância entre os C α de alguns pares de resíduos de aminoácidos do segmento N106-T123 que correspondente ao peptídeo I na estrutura cristalográfica da proteína íntegra. A **Tabela 5** mostra que os pares de resíduos G110-C117, G110-T123, L111-S116, V109-S116, V109-T123 apresentaram distâncias entre os respectivos C α de aproximadamente 6,5 Å, que é próxima à distância média entre os C α de uma cistina. Estes pares poderiam ser substituídos por duas cisteínas que seriam oxidados para a formação de uma cistina de modo a obedecer o distanciamento entre os outros resíduos adjacentes a eles observado na proteína. Foram selecionados para substituição apenas os pares que incluíam a G110 ou a L111 porque na estrutura tridimensional (**Figura 4**, pág. 9) da proteína estes resíduos se encontravam numa área menos exposta ao solvente e, portanto, possivelmente menos envolvida na interação com os FGFRs celulares.

Uma lista numerosa de peptídeos foi assim gerada. A maioria deles foi submetida aos cálculos de mecânica e dinâmica moleculares em alta temperatura (HTMD). Os resultados obtidos possibilitaram uma comparação dos confôrmeros em termos de energia e de estrutura entre si e com aquelas exibidas pelo segmento correspondente no FGF-1. Estes estão apresentados nas tabelas e discutidos a seguir.

Em geral, peptídeos contendo ciclos com mais de nove resíduos mostraram uma liberdade conformacional próxima àquela demonstrada pelos peptídeos lineares correspondentes. A mesma tendência foi observada quando, ao invés de ciclização via formação de ligação dissulfeto, foram introduzidas substituições de resíduos que possibilitassem a ciclização via lactama (dados não mostrados).

Resíduos de aminoácidos	Distâncias entre os C α (A)
N106 - S116	16,5
N106 - G120	8,0
N106 - P121	8,5
N106 - T123	8,5
G110 - C117	6,0
G110 - G120	8,0
G110 - P121	11,0
G110 -T123	6,5
L111 - S116	4,5
L111 - G120	11,0
L111 - P121	13,0
L111 - T123	9,0
V109 - S116	8,0
V109 - G120	7,0
V109 - P121	10,5
V109 - T123	7.0

Tabela 5: Distâncias entre os Ca dos resíduos de aminoácidos do loop 121-138 do FGF-1 humano.

O estudo da dinâmica molecular do peptídeo **Ac-HAEKNWF-NH**₂ em alta temperatura (800 K) durante 100 ps nos levaram à identificação de quatro conformações que possuíam energias significativamente mais baixas que as demais (**Tabela 6**).

Tabela 6: Valores de RMS e de energia correspondentes às conformações teóricas adotadas pelo peptídeo Ac-HAEKNWF-NH₂.

Conformação	RMS (Å)	E (kcal/mol)
1	1,78	+9,12
2	2,85	-2,98
3	2,24	1,70
4	1,93	-3,42

Essas conformações apresentaram dobramentos semelhantes àquele do segmento correspondente no hFGF-1, tendo sido o RMS médio resultante da comparação entre os respectivos esqueletos de 2,20 Å (Figura 15). A conservação estrutural observada pareceu estar relacionada com a conservação do *cluster* formado pelas cadeias laterais de H102, W107 e F108. Além disso, essas conformações mostraram possuir estabilidades também comparáveis entre si e após minimização com a da conformação equivalente àquela do segmento correspondente no hFGF-1.

Estes resultados nos levaram a concluir que o peptídeo **Ac-HAEKNWF-NH**₂ não necessitaria de qualquer restrição conformacional.

Uma variação na seqüência do peptídeo acima foi feita pela extensão da mesma no sentido N-terminal de forma que se incluísse todos os resíduos expostos da alça. Isto nos levou à proposição do peptídeo **Ac-SKKHAEKNWF-NH**₂. A análise teórica de suas propriedades dinâmicas revelaram que o peptídeo assumia conformações intermediárias entre duas famílias principais de conformações (**Figura 16**).

Neste segmento e nas adjacências, as cadeias laterais de dois resíduos de aminoácidos, a S99 e a A103, encontravam-se em uma posição particularmente favorável à ciclização no que diz respeito a orientação das mesmas em direções convenientes para tal e distância entre os respectivos Cαs de 5,63 Å.

Essa distância era muito próxima daquela medida em cisteínas envolvidas em ligação

dissulfeto (6,5 Å) e, portanto, muito apropriada para a proposição de seu análogo cíclico: o **c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH**₂]. Neste, a S99 e a A103 foram substituídas por duas cisteínas para que as mesmas formassem uma ligação dissulfeto intramolecular através da oxidação dos seus grupos sulfidrila.



Figura 15: Conformações teóricas do peptídeo Ac-HAEKNWF-NH₂.



Figura 16: Comparação entre as conformações teóricas do peptídeo Ac-SKKHAEKNWF-NH₂

Os cálculos teóricos das propriedades dinâmicas do peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] mostraram que este era menos flexível que o seu análogo linear, o Ac-SKKHAEKNWF-NH₂, exibindo pouca variabilidade de confôrmeros dentro do seu espaço conformacional. De fato, como se pode ver na Figura 17, as quatro principais famílias de conformações foram muito semelhantes entre si estruturalmente (RMS<2,00 Å) e em termos de energia. Além disso, as conformações assumidas por este peptídeo durante as simulações foram também bastante semelhantes àquela adotada pelo fragmento correspondente na proteína íntegra. Além da menor flexibilidade observada em relação ao análogo linear, os resultados de modelagem molecular mostrados a seguir obtidos para os fragmentos SKKHA e CKKHC foram outros indicativos de que o peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] poderia ter a mesma tendência em permanecer no mesmo enovelamento que o trecho 99-108 no FGF-1 humano.



Figura 17: Conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH2].

A **Figura 18** mostra a estrutura que representa a média de conformações obtidas na simulação dos movimentos moleculares espontâneos de **Ac-SKKHA-NH**₂ se comparada com a do fragmento correspondente no FGF-1, pode-se dizer que este segmento é bastante rígido e adota uma conformação muito semelhante àquela adotada pelo mesmo na proteína.



Figura 18: Conformação teórica média do peptídeo Ac-SKKHA-NH₂ (VI).

A modelagem molecular feita somente no segmento CKKHC confirmou a rigidez desta seqüência. O RMS resultante da comparação entre as conformações obtidas pela simulação e sem qualquer refinamento de energia foi de 2,00 Å.

A Figura 19 mostra que a média das conformações assumidas pelo peptídeo c(1-

5)[Ac-CKKHC-NH₂] (**VII**) durante a simulação foi muito semelhante àquela adotada pelo fragmento correspondente na molécula do FGF-1.



Figura 19: Comparação entre as conformações teóricas do peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHC-NH₂ (VII)].

O peptídeo c(3-7)[Ac-WFCGLPCKRGPRT-NH₂] apresentou conformações muito variáveis sem qualquer preferência por uma conformação definida e estável. Os valores de RMS resultantes da comparação entre as coordenadas espaciais das estruturas coletadas e as coordenadas do segmento correspondente no FGF-1 foram superiores a 5,0 Å. Concluímos, portanto, que a ciclização não restringiria suficientemente a conformação deste peptídeo, possivelmente, devido a uma desproporção entre o tamanho do ciclo e o número de resíduos não envolvidos nele.

Assim como o peptídeo acima, o peptídeo c(4-6)[Ac-WFVCLPCKRGPRT-NH₂] apresentou uma grande flexibilidade causada pela total ineficácia de um pequeno ciclo para a restrição de sua conformação. Neste caso, foi possível concluir pelos dados da **Tabela 7** que somente o anel se manteve rígido. Os altos valores de RMS observados seriam, portanto, devidos aos movimentos espontâneos dos segmentos adjacentes ao ciclo.

Conformação	Energia Total (kcal/mol)	RMS das conformações coletadas comparadas com a do FGF-1 (Å)
1	181,65	5,0
2	193,15	4,6
3	199,22	5,2
4	191,74	4,6
5	194,68	6,4
6	192,36	6,4
7	201,33	6,1
8	194,40	6,4
9	196,61	5,8

Tabela 7:	Energia	das	amostras	de	conformações	teóricas
adotadas	pelo pep	tídeo	c(4-6)[Ac-	WFV	/CLPCKRGPRT-	NH ₂]

No caso do peptídeo c(4-13)[Ac-WFVCLPSKRGPRC-NH₂], as conformações coletadas durante a simulação e após o refinamento de suas estruturas puderam ser agrupadas em uma única família de conformações estáveis,. Entretanto, essa família não apresentou semelhança conformacional significativa com segmento correspondente no hFGF-1. Como mostra a **Tabela 8** o valor de RMS resultante da comparação entre as conformações adotadas pelo peptídeo e a do segmento correspondente na proteína foi de 3,8 Å. A ponte dissulfeto pareceu ser eficiente para a manutenção das extremidades do peptídeo relativamente próximas uma da outra.

Conformação	Energia Total (kcal/mol)	RMS das conformações coletadas comparadas com a do FGF-1 (Å)
1	202,86	2,4
2	211,14	4,8
3	209,44	4,8
4	211,89	3,9
5	211,44	3,7
6	211,14	2,7
7	201,62	4,6
8	215,36	3,4

Tabela 8: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(4-13)[Ac-WFVCLPSKRGPRC-NH₂]

O ciclo do peptídeo c(3-7)[Ac-WFCGLPCKR-NH₂] mostrou ser bastante estável durante a HTMD, mantendo-se praticamente imóvel. As pequenas variações observadas entre as conformações coletadas foram, portanto, atribuídas a pequenos movimentos das cadeias laterais dos resíduos não envolvidos no ciclo (Tabela 9). O valor de RMS global calculado através da comparação entre as conformações coletadas/refinadas e a do segmento correspondente na estrutura do FGF-1 foi de 2,8 Å. Observada individualmente, a conformação 7 deste peptídeo exibiu uma estrutura que pode ser considerada idêntica àquela no FGF-1. Pode-se dizer também que a conformação 3 era muito parecida com tal estrutura, apresentando uma pequena variação na orientação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes na extremidade C-terminal. As outras conformações coletadas mostraram-se muito parecidas entre si, diferindo da estrutura do FGF-1 apenas na posição das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes nas extremidades N- e C- terminais.

Conformação	Energia Total (kcal/mol)	RMS das conformações coletadas comparadas com FGF-1 (Å)
1	175,51	2,5
2	169,18	2,9
3	164,12	3,0
4	169,09	2,7
5	163,88	2,6
6	164,83	2,2
7	169,58	4,3
8	161,41	2,5

Tabela 9: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(3-7)[Ac-WFCGLPCKR-NH₂]

As duas principais famílias de conformações do peptídeo **c(3-13)[Ac-WFCGLPSKRGPRC-NH**₂] representadas por 6 e 7 na **Tabela 10** apresentaram RMS ~2,6 Å e por 1, 2 e 5 com RMS ~4,00 Å). Essas conformações continham os seguintes elementos estruturais similares às do segmento correspondente no FGF-1: a) presença de dois fragmentos principais quase paralelos ligados por uma prolina; b) forte tendência à formação de dobra β (*b-turn*) causada pela seqüência dos resíduos conservados Gly e Pro.

Conformação	Energia Total (kcal/mol)	RMS das conformações coletadas comparadas com FGF-1 (Å)
1	198,95	4,3
2	203,15	3,5
3	207,07	3,5
4	192,93	3,5
5	195,20	3,2
6	201,93	2,6
7	201,22	2,6
8	191,05	3,9
9	198,58	3,6
10	198,52	3,8

Tabela 10: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(1-13)[Ac-WFCGLPSKRGPRC-NH₂]

O peptídeo c(4-7)[Ac-WFVCLPCKR-NH₂] contém um ciclo pequeno formado por apenas quatro resíduos e se mostrou suficientemente rígido durante a simulação por HTMD. Uma grande variação de RMS foi observada em apenas duas conformações (5 e 9), o que foi atribuída a uma alta mobilidade das extremidades (**Tabela 11**). As outras conformações apresentaram uma variação muito pequena e exibiram uma tendência em adotar uma conformação semelhante àquela exibida pela estrutura pelo segmento correspondente na proteína.

Conformação	Energia Total (kcal/mol)	RMS das conformações coletadas comparadas com FGF-1(Å)
1	179,65	4,5
2	187,98	4,6
3	182,26	2,8
4	181,31	2,3
5	199,77	7,3
6	185,41	3,3
7	188,85	6,0
8	176,77	3,9
9	185,36	6,9
10	186,40	4,8

Tabela 11: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo c(4-7)[Ac-WFVCLPCKR-NH₂]

Já o peptídeo **Ac-WFVGLPSKR-NH**₂ apresentou, durante a simulação por HTMD, uma tendência natural ao enovelamento, acomodando-se em uma família de conformações estáveis (**Tabela 12**). Entretanto, nenhum dos representantes dessa família exibiu as características da dobra β desejada. As conformações observadas formaram uma alça bem definida em torno dos resíduos Val-Gly-Leu, sendo esta bem mais acentuada e diferente da
dobra vizinha à prolina.

Conformação	Energia Total (kcal/mol)	RMS das conformações coletadas comparadas com FGF-1(Å)
1 e 2	170,73	2,1
3	162,60	3,8
4	170,84	2,3
5	161,09	4,1
6	170,70	2,9
7 e 8	162,60	3,3
9 e 10	158,23	3,4

Tabela 12: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo Ac-WFVGLPSKR-NH₂

O peptídeo linear **Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH**₂ apresentou um comportamento conformacional teórico similar ao do peptídeo **Ac-WFVGLPSKR-NH**₂, tendo, entretanto, demonstrado uma flexibilidade maior de suas extremidades. As conformações resultantes dos cálculos teóricos afastam-se ainda mais da estrutura da molécula de FGF-1 (**Tabela 13**.)

Conformação	Energia Total (kcal/mol)	RMS das conformações coletadas comparadas com a do FGF-1(Å)		
1	194,09	5,2		
2	208,05	6,6		
3	199,16	4,5 5,2		
4	195,05			
5	191,59	3,2		
6	216,56	6,6		
7	191,44	6,0		
8	189,56	5,5		

Tabela 13: Energia das amostras de conformações teóricas adotadas pelo peptídeo Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH₂

Alguns peptídeos foram desenhados apenas com base nos resultados experimentais obtidos em nosso laboratório com os outros peptídeos derivados do sítio 2 do hFGF-1, não tendo por isto sido submetidos aos cálculos teóricos de dinâmica molecular.

O peptídeo c(1-5)[Ac-DKKHDbuEKNWF-NH₂] constitui-se em um análogo do peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] mitogênico. O mesmo incluía uma ciclização via a formação de ligação lactama entre as cadeias laterais dos ácidos aspártico e diaminobutírico (Dbu), os quais foram escolhidos com o objetivo de manter entre os carbonos alfas a mesma distância encontrada entre os carbonos alfas das cisteínas no peptídeo mitogênico. Este peptídeo seria um análogo quimicamente mais estável do que o peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] e provavelmente poderia apresentar uma preferência conformacional similar a deste último.

Os peptídeos **Ac-WFVGLKANGSSKRGPRT-NH**₂ e **Ac-WFVGLAKNGSSKRGPRT-NH**₂ foram desenhados como análogos que possibilitassem esclarecer a contribuição estrutural efetiva do resíduo de lisina (K⁶) para a atividade mitogênica e ligação aos receptores celulares encontradas para os peptídeos Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ e Ac-WFVGLK-NGSSKRGPRT-NH₂.

4.2.2. Peptídeos derivados do DIII do receptor FGFR-1b

Como descrito anteriormente, **Ac-NTTDKENEVLH-NH**₂ e **Ac-SLAGNSIGLSH-NH**₂ possuem seqüências homólogas às do domínio DIII do FGFR-1 β e foram desenhados com base no ajuste teórico das moléculas de hFGF-1 e de HEP junto ao modelo do receptor FGFR-1 β descrito por Oyama e colaboradores (1997). A análise das orientações relativas das moléculas assim ajustadas mostrou que os "loops" DE e FG localizados no domínio DIII do FGFR-1 β poderiam se ligar ao sítio 2 da molécula do FGF-1. Assim, os peptídeos das mesmas regiões do receptor poderiam atuar como inibidores da ação do hFGF-1.

4.3. SÍNTESE, CICLIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE PEPTÍDEOS

4.3.1. Resultados e Discussão

De maneira geral, o processo de elongamento dos peptídeos sobre o suporte polimérico utilizado foi razoavelmente simples. A **Tabela 14** mostra os ganhos de massa e os valores percentuais da recuperação dos peptídeos brutos a partir da clivagem da resina MBHA e simultânea desproteção total.

As reações de ciclização via formação de ligação lactama, que ocorreram previamente a este passo, também foram realizados sem grandes dificuldades. Isto se deve unicamente às seqüências dos peptídeos e tamanhos dos peptídeos com os quais trabalhamos.

Já as reações de oxidação dos grupos sulfidrilas das cisteínas para formação dos pontos dissulfeto e obtenção dos peptídeos ciclizados nem sempre foram rápidas, simples e eficientes. Tivemos que empregar metodologias complementares e alternativas.

A **Tabela 14** descreve os dados de caracterização química dos compostos obtidos, enquanto que a **Tabela 15** sumariza as condições experimentais empregadas para sua avaliação por RP-HPLC analítica.

Alguns detalhes da síntese, ciclização e purificação de alguns dos peptídeos sintetizados são descritos a seguir, acompanhadas das **Figuras 20** a **34**, que mostram os perfis cromatográficos de RP-HPLC obtidos.

Na maioria dos casos, as purificações foram trabalhosas e demoradas. Graças à metodologia por nós empregada que lança mão de dois sistemas de solventes, cortes manuais e um monitoramento minucioso conseguimos separar os peptídeos desejados de contaminantes de comportamento cromatográfico extremamente similar. Tal sucesso nem sempre é conseguido em laboratórios de síntese de peptídeos. Muitos dos contaminantes presentes nos materiais brutos foram caracterizados, tendo sido evidenciado por análise de seus hidrolisados e por espectrometria de massa que eles consistiam em produtos de deleção.

A ocorrência de deleções pareceu ser sintomática para peptídeos desta região do hFGF-1.

Tabela 14: Síntese, purificação e caracterização química dos peptídeos estudados

				DADOS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA			ÃO QUÍMICA	
DAD	OS DE SÍ	NTESE E PURI	FICAÇÃO	RP-HPLC Espectromet de massas		Espectrometria de massas	Análise de aminoácidos	
Peptídeo	Ganho de massa (ma)	Recuperação da clivagem (%)	Recuperação da purificação (mg%)	T _R ; Concentração de ACN para eluição (min): 1%1	Pureza em TFA (%)	MALDI-TOF MS ou ESI-MS (m/z) obs (calcd)	Composição Molar obs (esperado)	
I	(12 69,0	51,4	22,3/11,2	8,62 [29,17]	99,0	1959,2 (1960,3)	Asp/Asn: 1,07 (1,0); Thr: 0,99 (1,0); Ser: 1,91 (2,0); Gly: 3,44 (3,0); Val: 0,60 (1,0); Leu: 1,0 (1,0); Phe: 0,64(1,0); Lys: 2,91 (3,0); Arg: 2,34 (2,0); Pro: 1,03 (1,0).	
"	282,0	70,1	23,1	11,34[24,80]	93,0	973,02 (973,08)	Asp/Asn: 059 (1,0); His: 1,07 (1,0); Ala: 1,14 (1,0); Glu: 1,27 (1,0); Lys: 0,93 (1,0); Trp: ND; Phe: 1,0 (1,0).	
	340.8	53,4	53,0	13.63 [20,17]	96,0	1316,1 (1316,5)	Asp/Asn: 0,40 (1,0); Ser: 0,59 (1,0); Lys: 2,5 (3,0); His: 0,85 (1,0); Glu: 0,97 (1,0); Trp: ND; Phe: 0,81 (1,0).	
IV	920.8	40,6	53,0	14,32 [20.59]	99,0	1363.0 (1362.8)	Asp/Asn: 0,31 (1,0); Glu: 1,01 (1,0); Phe: 0,91 (1,0); Lys: 2,18 (3,0); His: 0,92 (1,0); Cistina: 0,67 (1,0).	
VI	210,8	32,4	*/3,3	14,88 [19.95]	94,0	611,0 (611,8)	Ser:0,71 (1,0); Ala: 0,91 (1,0); His: 0,83 (1,0); Lys: 1,55 (2,0).	
VII	435,9	54,3	1,6	7,31 [14,92]	93,0	657,2 (657,2)	Cistina: 0,62 (1,0); Lys: 1,52 (2,0); His: 0,87 (1,0).	
VIII	360,8	47,2	ND	*	*	**(1881, 4)	ND	
іх	1203,0	48,0	6,3	15,56 [30,56]	>95,0	1352,0 (1355,5)	Asn/Asp: 1,17 (2,0); Glu: 1,03 (1,0); Phe: 1,00 (1,0); His: 0,86 (1,0); Lys: 2,55 (3,0).	
x	ND	ND	16,9/8,4	8,90 [29,34] 9.29 [29.57]	98,0	1831,1 (1814,1)	Asp/Asn: 0,68 (1,0); Thr: 0,58 (1,0); Ser: 1,35 (2,0); Gly: 2,20 (3,0); Val: 0,37 (1,0); Leu: 1,0 (1,0); Phe: 0,38 (1,0); Lys: 1,30 (2,0); Arg: 1,50 (2,0); Pro: 0,51 (1,0).	
хі	343,4	54,9	35,0	10,27 [33,16]	92,0	1131,0 (1131,5)	Ser: 0,92 (1,0); Gly:1,02 (1,0); Leu: 1,00 (1,0); Phe: 1,00 (1,0); Lys: 1,03 (1,0); Arg: 1,05 (1,0); Pro: 0,98 (1,0); Val: 0,99 (1,0)	
XII	145,3	53,6	1,0	12,2 [55.98]*	50,0*	1191,0 (1190,5)	ND	
XIII	377,2	50,0	21,7	10,97 [30.58]	>95,0	1148,0 (1148,6)	Pro: 1,08 (1,0); cistina: 0,99 (1,0); Gly: 0,91 (1,0); Leu: 1,09 (1,0); Phe: 0,88 (1,0); Arg: 0,91 (1,0); Lys: 1,13 (1,0).	
xıv	618,1	56,3	29,8	11,73 [31,0]	97,0	1543,0 (1542,9)	Thr: 0,64 (1,0); Ser: 0,77 (1,0); Pro: 1,44 (2,0); Gly:1,51 (2,0); Val: 0,81 (1,0); Leu: 0,75 (1,0); Phe: 0,69 (1,0); Lys: 0,77 (1,0); Arg: 1,61 (2,0)	
xv	531,6	50,0	6,4	17.56 [34.53]	>95,0	1546,7 (1546,1)	Ser: 0,65 (1,0); Pro: 1,77 (2,0); cistina: 0,53 (1,0); Gly: 1,84 (2,0); Leu: 1,0 (1,0); Phe: 0,81 (1,0); Arg: 1,86 (2,0); Lys: 0,91 (1,0).	
XVI	665,0	52,3	53,9	10,84 [30,50]	>99,0	1903,2 (1901, <i>2</i>)	Asp/Asn: 0,70 (1,0); Thr: 0,66 (1,0); Ser: 2,00 (2,0); Gly: 2,24 (3,0); Val: 0,56 (1,0); Leu: 0,52 (1,0); Phe: 0,47 (1,0); Lys: 1,45 (2,0); Arg: 2,03 (2,0); Pro: 0,40 (1,0).	
XVII	720,0	57,1	52,08	10,80 [30,48]	96,0	1902,9 (1901,2)	Asp/Asn: 0,66 (1,0); Thr: 0,58 (1,0); Ser: 2,00 (2,0); Gly: 2,30 (3,0); Val: 0,49 (1,0); Leu: 1,00 (1,0); Phe: 0,46 (1,0); Lys: 1,42 (2,0); Arg: 1,62 (2,0); Pro: 0,40 (1,0).	
XVIII	315,9	57,6	34,5	8,33 [16.99]	91,0	1339,0 (1340,6)	Asp/Asn: 2,72 (3,0); Thr: 1,88 (2,0); Glu: 2,06 (2,0); Val: 0,99 (1,00); Leu: 1,00 (1,0); His: 1,01 (1,0); Lys: 1,03 (1,0)	
хіх	212,9	53,5	61,7	7,14 [16,28]	84,0	1097,0 (1096,5)	Asp/Asn: 0,88 (1,0); Leu: 1,8 (2,0); Ile: 0,73 (1,0); Ala: 1,0 (1,0): Gly: 1,61 (2,0); Ser: 2,20 (3,0).	

(*) separação parcial dos componentes – (**)2 componentes – T_R = tempo de retenção – ND = não determinado.

A **Tabela 15** descreve as condições de análise empregadas para a avaliação dos peptídeos purificados obtidos.

Peptídeo	Solvente A	Solvente B	Gradiente	Tempo de retenção (min)	Grau de pureza (%/TFA)
I	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$40 \rightarrow 60\%B \text{ em } 20 \text{ min}$	8,62	99,4
II	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	30 ightarrow 60%B em 30 min	11,34	92,8
III	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$20 \rightarrow 40\%B$ em 20 min	0%B em 20 min 10,38	
¹ IV	100% TEAP	60%ACN/ TEAP	$20 \rightarrow 40\%B \text{ em } 20 \text{ min}$	10,11	86,0
² IV	100% TEAP	60%ACN/ TEAP	25 ightarrow 45%B em 20 min	11,63	92,5
v	100%TEAP	60%ACN/ TEAP	$20 \rightarrow 40\%B \text{ em } 20 \text{ min}$	10.46	89,0
VI	0,1% TFA	40%ACN/ 0,09% TFA	35 ightarrow 55%B em 20 min	14,88	93,7
VII	0,1% TFA	40%ACN/ 0,09% TFA	30 ightarrow 60% B em 30 min	7,31	92,8
VIII	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$5 \rightarrow 95\%B$ em 30 min	*	*
IX	100% TEAP	60%ACN/ 0,09% TEAP	$15 \rightarrow 35~\%B$ em 20 min	14.14	>95
Х	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	40 ightarrow 60%B em 20 min	8,90	98,4
XI	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	45 ightarrow 65%B em 30 min	10,27	92,1
XII	0,1% TFA	90%ACN/ 0,09% TFA	$50 \rightarrow 70$ %B em 20 min	5,92+6.30	~50*
XIII	100% TEAP	60%ACN/ TEAP	$25{\rightarrow}65$ %B em 30 min	18,13	>95
XIV	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$40 \rightarrow 60\%B \text{ em } 20 \text{ min}$	11,73	96,5
XV	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$40 \rightarrow 60 \ \%B \ em \ 20 \ min$	17,56	> 95
XVI	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$40 \rightarrow 60 \ \%B \ em \ 20 \ min$	10,84	>95
XVII	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$40 \rightarrow 60 \ \%B \ em \ 20 \ min$	10,80	> 95
XVIII	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	20 ightarrow 40%B em 20 min	8,33	91,2
XIX	0,1% TFA	60%ACN/ 0,09% TFA	$20 \rightarrow 40\%B$ em 20 min	7,14	84,2

Tabela 15: Condições experimentais de RP-HPLC analítica dos peptídeos purificados.

1- Peptídeo IV isolado da mistura com o peptídeo V; 2- peptídeo IV ressintetizado e ciclizado; *- peptídeo parcialmente purificado; **comprimento de onda: 220 nm e o fluxo: 1 mL/min (para análise) e10 mL/min (para as purificações).

• Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂(I) e Ac-WFVGLKNGSSKRGPRT-NH₂(X)

O peptídeo I, utilizado por nós como referência por ser mitogênico, foi sintetizado. O perfis cromatográficos do material bruto está mostrado na **Figura 20.A** Como é possível observar, existem dois produtos majoritários. Estes foram, portanto, purificados nas seguintes condições experimentais: coluna Vydac C18, fluxo:10 mL/min, λ : 210 nm, gradiente: 0,33% de solvente B/min em dois sistemas de solventes: 1) constituído por solvente A: 100% TEAP/H₂0, solvente B: 60% ACN/TEAP, gradiente: 25 a 55% de solvente B em 90 min; 2) constituído por solvente A: 0,1% TFA/H₂0, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O, gradientes: 30 a 60% de solvente B em 60 min (peptídeo I) e 45 a 65% de solvente B em 40 min (peptídeo de t_R=9,87 min).

As **Figuras 20.B** e **20.C** mostram os perfis cromatográficos dos purificados quando estes foram analisados em sistema que utiliza TFA.

Os dados de caracterização evidenciaram que o purificado de t_R =8,62 min correspondia ao Ac-WFVGLKNGSSKRGPRT-NH₂ (peptídeo **X**, **Tabela 1**, pág. xiii), ou seja, este era um análogo do peptídeo I que apresentava deleção de uma das três lisinas presentes em I.



Figura 20: Perfis de RP-HPLC dos peptídeos I e X. A = material bruto; B = peptídeo I purificado; C = peptídeo IV purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; solvente A: H₂0/0,1% TFA; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradiente linear: 40-60% de B em 20 min (1% B/min); fluxo: 1ml/min; **I**: 210 nm. {Abs] = Absorbância.

Em virtude do grande número de ensaios de atividade mitogênica utilizando-se este peptídeo como referência, foi necessário posteriormente preparar novos lotes destes compostos. A Figura 21 mostra o perfil cromatográfico do material bruto (Figura 21.C) e dos purificados (Figura 21.B e 21.c).

Ac-HAEKNWF-NH₂ (II) e Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (III)

Os peptídeos II e III foram sintetizados següencialmente. III foi elongado a partir de 652 mg da peptidil-resina II obtida. 290 mg foram acetilados para posterior clivagem com HF e obtenção de II e 387 mg foram utilizados para elongamento e obtenção de III. Os perfis cromatográficos dos materiais brutos e purificados de II estão mostrados nas Figura 22. A Figura 23 mostra os perfis cromatográficos dos materiais brutos e purificados de III. A purificação destes dois peptídeos foi feita nas seguintes condições experimentais: coluna Vydac C18, solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O, fluxo: 10 mL/min, λ : 210 nm, gradiente: 25 a 55% de solvente B em 90 min.



Figura 21: Perfis de RP-HPLC dos peptídeos I e X. A = material bruto; B = peptídeo I purificado; C = peptídeo X purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; solvente A: H₂0/0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min para A, 40-60% de B em 20 min para B e C; fluxo: 1ml/min. (Abs = absorbância)



Tempo (min)

Figura 22: Perfis de RP-HPLC do peptídeo II. A = material bruto; B = peptídeo purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; solvente A: H₂0/0,1% TFA; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min para A, 30-60% de B em 30 min para B; fluxo: 1ml/min. (Abs = absorbância)



Tempo (min)

Figura 23: Perfis de RP-HPLC do peptídeo III purificado. A = em TFA; B = em TEAP. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; fluxo: 1ml/min; Ⅰ: 210 nm; solvente A: TEAP e solvente B: 60% ACN/TEAP e gradiente linear: 20-40% de B em 20 min (A); solvente A: H₂0/0,1% TFA EM H₂O; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA e gradiente linear: 25-45% de B em 20 min (B).

Ciclo(1-5) [Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] (IV), ciclo(1-5) [Ac-CKKHCEKWF-NH₂] (V) e ciclo(1-5) [Ac-CKKHC-NH₂] (VII)

Os peptídeos **IV** e **VII** brutos não ficaram retidos na coluna Vydac C-18 quando se utilizou solvente B constituído de 60% ACN/0,09% TFA em H₂O para o monitoramento por RP-HPLC das reações de ciclização. Por isto, testamos novos solventes B de concentrações de ACN menores. Para a análise do peptídeo **VII**, pudemos concluir que eram necessárias as seguintes condições: coluna C18; solvente A - 0,1 % TFA/H₂O; solvente B - 40% ACN/H₂O/0,09%TFA em H₂O ; gradiente -5%B a 95%B em 30 min e fluxo 1mL/min. Nas mesmas condições, a análise do peptídeo **IV** somente foi possível quando utilizada uma coluna Vydac C-4.

Tentamos concentrar as soluções de ciclização destes peptídeos em coluna de resina aniônica Bio-Rex70, 200- 400 mesh, equilibrada em pH 5,0. A seletividade da resina pelos peptídeos foi monitorada pela análise do eluente e do eluído por RP-HPLC. Quando submetidos à eletroforese em papel, os eluídos migraram para o polo negativo, podendo ser revelados por reação com ninidrina ou com o reagente de Pauly: os resultados confirmaram as cargas positivas de **IV** e **V**, neste pH. Além disso, a revelação com ninidrina indicou a presença de grupo NH₂ livre nos materiais analisados, confirmando a presença de Lys, visto que os N terminais eram acetilados. Por outro lado, a revelação com o reagente de Pauly, específico para His, indicou a presença de His. Em resumo, os eluídos continham os peptídeos desejadosem solução concentrada.

Assim, determinamos as condições ideais para a análise e purificação destes compostos por RP-HPLC:

Peptídeo IV:

<u>RP-HPLC analítica</u>: coluna: Vydac C-18 (0,46 cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å); solvente A: 0,1 % TFA/ H₂O; solvente B: 40%ACN/ 0,09%TFA em H₂O; gradiente linear: 30-60% B em 30 min; fluxo: 1mL/min; λ : 210 nm. Os tempos de retenção foram: 10,89 min (suposto linear); 13,57 min (suposto monômero oxidado).

<u>RP-HPLC preparativa</u>: coluna Vydac C-18 (2,2cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å); solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; solvente B: 40%ACN/0,09%TFA em H₂O; gradiente linear: 20-50% B em 60 min; fluxo: 10mL/min; λ : 220 nm.

Peptídeo VII:

<u>RP-HPLC analítica</u>: coluna Vydac C-4, (0,45cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å); solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; solvente B: 60% ACN/0,09%TFA em H₂O; gradiente linear: 5-95% B em 30 min; fluxo: 1mL/min, λ : 210 nm. Os tempos de retenção foram: 7,18 min (suposto linear); 17,16 min (suposto monômero oxidado).

<u>RP-HPLC preparativa</u>: coluna Vydac C-4 (2,2 cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å);solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; solvente B: 60%ACN/0,09%TFA em H₂O; gradiente linear: 550% B em 90 min; fluxo: 10mL/min; λ : 220 nm.

Os cromatogramas referentes ao acompanhamento das ciclizações por RP-HPLC, assim como o perfil do peptídeo IV purificado, podem ser vistos nas Figuras 24-27. É possível observar que, tanto a ciclização por oxidação pelo ar como por K₃Fe(CN)₆ não foram completas mesmo após 24 h. No final das reações, observou-se a presença de três produtos. Devido ao fato dos monômeros lineares nem sempre serem mais hidrofílicos do que os seus análogos cíclicos (Xue et al., 1996) tivemos dificuldade em prever qual seria o cíclico desejado, e, por isto, isolamos cada dos componentes presentes para posterior identificação por espectrometria de massas e análise de aminoácidos. Quando analisado com mais cuidado empregando-se o TEAP, pudemos perceber que o peptídeo desejado (Figura 25 C) continha um contaminante (Figuras 26 A). A separação entre o peptídeo IV e ele (Figura 26 B e C) seguida da caracterizaçãoquímica de ambos evidenciou que o contaminante era um análogo de IV que apresentava deleção do resíduo de asparagina (Peptídeo V).

Em relação às metodologias de ciclização destes peptídeos por nós empregados, inicialmente havíamos optado pela oxidação pelo ar devido ao fato de que a mesma ocorre em condições muito suaves de reação, assemelhando-se a reações "in vivo". Estas reações, entretanto, se processam muito lentamente: a ciclização do peptídeo **VII**, porexemplo, necessitou de 72 horas (Figura 28 B), enquanto que a do peptídeo **IV** demorou 96 horas (**Figuras 24** e **25**). Por esta razão, utilizamos K₃Fe(CN)₆ como reagente oxidante e, a oxidação das sulfidrilas dos resíduos de cisteína se deu em apenas duas horas. Também foi tentado para o peptídeo **IV** uma reação de oxidação a 37°C e a 50°C. Todos os meios reacionais foram, ao final das tentativas, juntados e rotaevaporados para obtenção de solução concentrada do material bruto (**Esquema 7**). Independentemente do método, tentamos garantir que a reação de oxidação seja intramolecular e náo intermolecular, utilizando-se solução de peptídeo bruto bastante diluída (0,2 a 0,3 mmoles de peptídeo). O grande volume da mesma geralmente dificulta o processo de rotaevaporação e/ou liofilização. A **Figura 25** mostra os

perfis de RP-HPLC do peptídeo VII antes e após purificação.

Como pode ser visto na **Tabela 14**, os rendimentos finais na obtenção dos peptídeos **IV**, **V** e **VII** foram inferiores a 2%: várias foram as fontes de perdas às quais os produtos desejados foram expostos.







Figura 24: Perfis de RP-HPLC do peptídeo IV bruto no início (A) e final da ciclização por de O₂ do ar (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-4; solvente A: 0,1% TFA; solvente B: 40% ACN/0,09% TFA em H₂O; fluxo: 1ml/min; I: 220 nm; gradiente linear: 5-95% de B em 30 min. (Abs = absorbância)



Tempo (min)

Figura 25: Perfis de RP-HPLC do peptídeo IV no início da ciclização (A), após 2 h de oxidação por K₃Fe(CN)₆ (B), após purificação (C).
 Condições experimentais: coluna: Vydac C-4; solvente A: 0,1% TFA; solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; fluxo: 1ml/min; 1: 220 nm; gradiente 5-95% de B em 30 min (solução de ciclização), 25-45% de B em 30 min (purificado). (Abs = absorbância)



Figura 26: Perfis de RP-HPLC dos peptídeos IV e V. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: TEAP, solvente B: 60% ACN/TEAP; gradiente: 20% a 40% de B em 20 min. A = peptídeo purificado em sistema TFA; B = peptídeo V repurificado segundo o Esquema 5 (sistema TEAP); C = peptídeo IV repurificado segundo o mesmo esquema. (Abs = absorbância)



Tempo (min)

Figura 27: Análise comparativa por RP-HPLC do peptídeo IV repurificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; Peptídeo IV purificado: A) solvente A: 0,1% TFA, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradiente: 30% a 50% de B em 20 min. B) solvente A: TEAP, solvente B: 60% ACN/TEAP; gradiente: 25% a 45% de B em 20 min. . (Abs = absorbância)



Figura 28: Perfis de RP-HPLC do peptídeo VII.

A = bruto no início da ciclização; B = no final da ciclização em presença de K₃Fe(CN)₆ 0,01 M; C = peptídeo purificado. Condições experimentais: coluna: C-4 Vydac, fluxo: 1ml/min; I: 220 nm; solvente A: 0,01% TFA,

solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H_2O ; gradiente: 5 - 95% de B em 30 min (A, B) e 30 - 60% de B em 30 min (C). (Abs = absorbância)

• Ac-SKKHA-NH₂ (VI)

Alguns problemas foram encontrados durante a análise e purificação deste peptídeo, que se mostrou bastante hidrofílico. A análise do extrato bruto por RP-HPLC mostrou a presença de dois componentes, sendo o principal eluido muito prematuramente em diferentes condições experimentais. Durante a purificação foi obtida uma fração principal que não forma produto sólido após a liofilização e 3,06 mg do componente correspondente ao pico secundário. A análise da composição de aminoácidos deste último, entretanto, revelou ser a aquela do peptídeo desejado.

Ciclo(5-14)[Ac-SKKHEEKNWFVGLKK-NH₂] (VIII)

O **Esquema 8** sumariza os passos executados para a ciclização da peptidil-resina correspondente ao peptídeo VIII. Devido à complexidade do peptídeo cíclico bruto evidenciada pelo cromatograma da **Figura 29.A** tentamos isolar os componentes majoritários deste peptídeo por RP-HPLC empregando dois sistemas de solventes e as seguintes condições experimentais: coluna C-18 Vydac; fluxo: 10 mL/min; λ: 220 nm. Inicialmente, foi empregado o sistema 1 de solventes: solvente A: TEAP (pH~2,05); solvente B: 60% ACN/TEAP; gradiente linear 25-45% de B em 60 min, tendo sido obtidas três frações (1, 2 e 3). Em seguida, as mesmas foram dessalinizadas separadamente variando o sistema de solventes: solvente A: 0,1% TFA; solvente B: 60 % ACN/0,09% TFA em H₂O; gradiente linear: 30-70% de B em 80 min) e liofilizadas. Quando se analisou novamente cada uma das frações por RP-HPLC, observou-se que as mesmas apresentavam *a*inda, um baixo grau de pureza. Mesmo assim, estas foram submetidas a análises de suas composições molares de aminoácidos e por

espectrometria de massas (EM) com o intuito de se identificar qual delas continha o peptídeo desejado (PM 1881,4). Nestas frações foram identificados pelo menos cinco componentes. Dois deles com pesos moleculares de 1968,9 e 1838,8 foram detectados na fração 1. A fração 2, continha um componente de massa molecular de 2065,1. O cíclico desejado foi encontrado na fração 3 e esta se constituía ainda de uma mistura de componentes (massas moleculares 2066,1 e 1881,4) com tempos de retenção em RP-HPLC muito próximos.

Para tentar obter material de melhor qualidade, tentamos aumentar a eficiência da reação de ciclização realizando-a a partir do restante da peptidil-resina (~100 mg) em alta temperatura (60°C). O solvente empregado desta vez foi a mistura 25% DMSO/tolueno, sendo o pH aparente mantido em ~9,0 até que o teste de ninidrina fosse negativo. O peptídeo cíclico bruto obtido após desproteção total, clivagem da resina e liofilização, foi analisado por RP-HPLC. O cromatograma obtido mostrou que a eficiência da ciclização não foi significativamente superior em relação àquela realizada a 37°C (**Figura 29.B**).

Estes resultados e dados obtidos por espectrometria de massas e análise da composição molar de aminoácidos de frações obtidas na tentativa de purificação destas misturas sugeriram que a formação de pequena quantidade do peptídeo desejado pode ter ocorrido devido: 1) à remoção incompleta do Fmoc das cadeias laterais de Glu⁵ ou Lys¹⁴; 2) ao impedimento estérico dos grupos funcionais para a formação da lactama, visto tratar-se de um peptídeo relativamente longo ligado a uma resina com grau muito elevado de substituição; 3) à desproteção incompleta das cadeias laterais dos resíduos do peptídeo por HF pode não ter sido total devido a impedimento estérico; 4) à ocorrência de deleção em alguns dos resíduos de Lys e/ou Asn.

Os resultados das análises realizadas estão mostrados abaixo:

- Fração 1: não determinado
- <u>Fração 2</u>: Asp/Asn: 0,54 (1,0); Ser: 0,77 (1,0); Glu/Gln: 2,01 (2,0); Gly: 1,1 (1,0); Val: 0,99 (1,0); Leu: 1,0 (1,0); Phe: 0,95 (1,0); His: 0,93 (1,0); Lys: 4,28 (5,0).
- <u>Fração 3:</u> Asp/Asn: 0,49 (1,0); Ser: 0,7 (1,0); Glu/Gln: 1,78 (2,0); Gly: 1,1 (1,0); Val: 0,92 (1,0); Leu: 1,0 (1,0); Phe: 0,91 (1,0); His: 0,87 (1,0); Lys: 3,67 (5,0).
- <u>Fração 1</u>: m/z observado = 1968,9 e 1838,8 (esperado: 1881,4)
- <u>Fração 2</u>: m/z observado = 2065,1 (esperado: 1881,4)
- Fração 3: m/z observados = 2066,1 e 1881,0 (esperado: 1881,4).

Estes dados indicaram que o peptídeo desejado **VIII** estava contido na fração 3. Entretanto, não fomos capazes de isolá-lo com qualidade superior a 60%.



ESQUEMA 8: Esquema da ciclização do peptídeo VIII



Tempo (min)

Figura 29: Perfis de RP-HPLC do peptídeo VIII bruto obtido após ciclização a 37°C (A) e após ciclização a 60°C (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradiente: 5-95% de B em 30 min.

• [ciclo(1-5)Ac-DKKHDbuEKNWF-NH₂] (IX)

Este peptídeo foi sintetizado, empregando-se uma resina MBHA com grau de substituição menor (0,42 mmoles/g) do que aquela utilizada para o peptídeo **VIII** (0,69-0,77 mmoles/g). O objetivo era minimizar as interações intercadeias peptídicas durante a formação da ponte lactama entre os resíduos Asp¹ e Dbu⁵ da peptidil-resina e talvez, melhorar a qualidade do peptídeo cíclico bruto .

Os acoplamentos entre os aminoácidos foram feitos com o reagente acoplador DIC em presença de HOBT, empregando-se DCM, DMF ou mistura de DCM:DMF (em diferentes proporções) como solventes. Mesmo aumentando-se o tempo de reação, estes acoplamentos foram bastante difíceis de serem completados, havendo a necessidade de realizar pelo menos dois reacoplamentos para cada um dos resíduos. Nestes casos, o solvente utilizado foi o NMP.

Conforme mostrado no **Esquema 9**, a massa total desta peptidil-resina obtida foi submetida à desproteção do Fmoc das cadeias laterais de Asp¹ e Dbu⁵ com piperidina 20%/DMF. Dois têrços da massa de peptidil-resina obtidos (cerca de 1,2 g) foram ciclizados com TBTU/DMF e em um pH aparente ao redor de 9,0 resultante da adição de algumas gôtas de DIPEA ao meio reacional. O restante da peptidil-resina, já parcialmente desprotegida, foi guardada para a obtenção do seu par linear correspondente. A formação da lactama ocorreu somente após três reações consecutivas de 90, 150 min e 24 h, quando o resultado do teste de ninidrina tornou-se negativo. Parte da peptidil-resina (0,7 g) foi então submetida à clivagem da MBHA e desproteção total. A análise por RP-HPLC do peptídeo bruto mostrou que o mesmo continha dois componentes majoritários com tempos de retenção muito próximos (**Figura 30**).





Purificamos por RP-HPLC, de acordo com o **Esquema 5**, os dois componentes empregando o Sistema 1 de solventes: A: TEAP e B: 60%ACN/TEAP; gradiente linear: 15-45% de B em 60 min; fluxo: 10 mL/min e λ : 220 nm. Cada um desses componentes foi dessalinizado nas mesmas condições de gradiente no Sistema 2 de solventes (A: 0,1% TFA e B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O) e utilizando o gradiente 30 a 40 % de B em 20 min. A **Figura 30 B** mostra o perfil cromatográfico do contaminante contido no peptídeo bruto que também foi purificado e caracterizado demonstrando ser um análogo que apresenta deleção de uma asparagina. As frações contendo o peptídeo desejado foram juntadas e liofilizadas, sendo obtidos 5,3 mg do mesmo com 97% de pureza (**Figura 30.C**).



Tempo (min)

Figura 30: Perfis de RP-HPLC do peptídeo IX bruto ciclizado (A) e purificado (B). (C) refere-se ao contaminante de t_R = 15,34 min purificado. Condições experimentais: coluna: Vydac C-18; fluxo: 1ml/min; solvente A: TEAP; solvente B: 60% ACN/TEAP; gradientes lineares: 5- 95% de B em 30 min (A); 15-35% de B em 20 min (B); 15-35% de B em 20 min (C).

• Ac-WFVGLPSKR-NH₂ (XI)

Os resultados obtidos durante a síntese e caracterização deste peptídeo estão descritos na **Tabela 14**. Os perfis cromatográficos correspondentes aos peptídeos bruto e purificado estão mostrados na **Figura 31**.



Figura 31: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XI bruto ciclizado (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: C-18 Vydac; fluxo: 1ml/min solvente A: TEAP, solvente B: 60% ACN/TEAP; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A); 45-65% de B em 30 min (B). (Abs = absorbância).

ciclo(4-7)[Ac-WFVCLPCKR-NH₂] (XII), ciclo(5-7)[Ac-WFCGLPCKR-NH₂] (XIII) e ciclo(4-13)[Ac-WFCGLPSKRGPRC-NH₂ (XV)

Estes peptídeos foram sintetizados simultaneamente. Durante a oxidação do peptídeo **XII** na presença de $K_3Fe(CN)_6$ houve a formação de precipitado na mistura reacional (**Esquema 10**). Terminada a reação, parte do precipitado formado foi solubilizado com 90%ACN/H₂O e juntado à solução de peptídeo bruto. A mistura foi concentrada por rotaevaporação e liofilizada. Durante a liofilização, o material mostrou-se aderente ao frasco. Foi tentada a sua solubilização em diferentes solventes. A fração solúvel em 50% ACN foi analisada por RP-HPLC, tendo demonstrado conter vários componentes (**Figura 32.A**). A purificação foi realizada nas condições que se seguem: coluna Vydac C-18 2,2 cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å; solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; solvente B: 90%ACN/0,09%TFA em H₂O; gradiente linear: 50-70%B em 60 min: fluxo: 10mL/min: λ : 210 nm. Uma análise por espectrometria indicou que a fração 1 continha o peptídeo desejado, apesar de impura (**Figura 32.B**).

A análise de aminoácidos de seu hidrolisado apresentou os picos correspondentes aos aminoácidos esperados (**Tabela 14**). Mesmo após purificação, dois componentes com tempos de retenção muito próximos foram detectados por RP-HPLC (**Figura 32.B**). A análise por espectrometria de massas (MALDFTOF) confirmou que um deles era o peptídeo cíclico desejado (**Tabela 14**).





TA = Temperatura Ambiente



Figura 32: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XII bruto ciclizado (A) e após purificação (B). Condições experimentais: coluna: C-18 Vydac; fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/ H₂O, solvente B: 90% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A); 50-70% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância).

O peptídeo XIII bruto teve suas sulfidrilas oxidadas pelo oxigênio do ar (**Esquema 10**). Por se tratar de uma oxidação mais branda e lenta, o tempo de reação foi de 120 horas. Por outro lado, não se observou a formação de nenhum precipitado no meio reacional, o que facilitou o monitoramento e a purificação do produto por RP-HPLC, nas seguintes condições experimentais: coluna Vydac C-18 preparativa (2,2 cm x 25,0 cm, 5µ, 300 Å); sistema de solventes: 0,1% TFA/H₂O (A) e 60% ACN/0,09% TFA em H₂O (B); fluxo: 10 mL/min: λ : 220 nm; gradiente linear: 25-65% de B em 60 min.

Os perfis cromatográficos estão mostrados na Figura 33.

• Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH₂ (XIV)

O baixo rendimento observado na **Tabela 14** para o peptídeo **XIV** decorreu de perdas acidentais de resina durante os passos de acoplamento e de clivagem do peptídeo-resina com HF. O peptideo bruto obtido foi purificado empregando-se o sistema de solventes contendo TFA (coluna: C-18 Vydac 2,2cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60%ACN/0,09%TFA, gradiente linear: 45-65% de B em 20 min, fluxo:1ml/min; λ : 210 nm). A **Figura 34** mostra os perfis cromatográficos do material bruto e purificado. Este peptídeo foi ressintetizado e purificado (**Figura 35**).







Figura 33: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XIII bruto antes (A), após a ciclização (B) e purificado (C). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min. Para (C) foi utilizado o sistema TEAP: solvente A: TEAP; solvente B: 60% ACN/TEAP; gradiente linear: 25-65% de B em 30 min (C). (Abs = absorbância)



Tempo (min)

Figura 34: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XIV bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 90% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A), 40-60% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância) Sumika Kiyota



Tempo (min)

Figura 35: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XIV bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A), 45-65% de B em 30 min (B). (Abs = absorbância)

A desproteção total e clivagem da resina seguidas de ciclização de XV foram realizadas da mesma maneira que para o peptídeo XII conforme mostrado no Esquema 10. Neste meio reacional, observou-se também a formação de precipitado após a adição da solução de K₈Fe(CN)₆ 0,01 M (Figura 36.A). Neste caso, esperou-se o final da reação de ciclização e decantação do precipitado formado, sendo este liofilizado separadamente do seu sobrenadante. A Figura 36.AB mostra os perfis cromatográficos obtidos na análise por RP-HPLC do material bruto (A) e do sobrenadante (B), respectivamente.

A purificação feita em escala preparativa (solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN/ 0,09% TFA em H₂O; gradiente: 45-65% de solvente B em 60 min; fluxo: 10 mL/min e λ : 220 nm) forneceu o peptídeo purificado (**Figura 36.C**) e uma fração secundária.

A análise de seus hidrolisados (**Tabela 14**) confirmou que o purificado era, de fato, o peptídeo **XV** e que a fração secundária era um contaminante que apresentava deleção de um resíduo de lisina: <u>Fração secundária:</u> Ser: 0,85 (1,0); Pro: 1,91 (2,0); cistina: 0,73 (1,0); Gly: 2,20 (2,0); Leu:1,0 (1,0); Phe:0,92 (1,0); Arg: 1,67 (2,0); Lys: 0,42 (1,0).

Os dados de espectrometria de massas (MALDFTOF) mostrados a seguir, confirmou este resultado: <u>Fração Secundária</u>: m/z observado = 1418,4* e 1390,2 (esperado: 1546,1; sendo 1418,4 correspondente à massa do peptídeo com deleção de uma Lys).



Tempo (min)

Figura 36: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XV bruto (A), sobrenadante da solução ciclização (B) E do peptídeo XV purificado (C). Condições experimentais: coluna: C-18 Vydac, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradiente: 5-95% de B em 30 min (A e B). O gradiente usado para (C) foi: 40 - 60% de B em 30 min. (Abs = absorbância)

• Ac-WFVGLKANGSSKRGPRT-NH₂ (XVI) e Ac-WFVGLAKNGSSKRGPRT-NH₂ (XVII)

As **Figuras 37** e **38** mostram os perfis cromatográficos obtidos na análise por RP-HPLC destes peptídeos em suas formas brutas e após purificação nas seguintes condições experimentais: coluna Vydac C-18 2,2cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60%ACN/0,09%TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (**XVI**), 25-55% de B em 30 min (**XVII**); fluxo: 10mL/min: λ : 210 nm. As condições de análise destes peptídeos foram as seguintes: coluna C-8 Vydac, 0,45cm x 25,0 cm, 5 μ , 300 Å; solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; solvente B: 90%ACN/0,09%TFA; gradientes lineares: 40-60% de B em 20 min (**XVI** e **XVII**); fluxo: 1mL/min; λ : 210 nm.

• Ac-NTTDKENEVLH-NH₂ (XVIII)

O perfil cromatográfico do peptídeo bruto está mostrado na **Figura 39 A** 140,4 mg deste peptídeo bruto foram purificados por RPHPLC, em coluna Vydac C-18 semi-preparativa, nas seguintes condições: solventes A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60%ACN/TFA em H₂O; gradiente linear: 15-45% B em 60 min. Foram obtidos 48,48 mg de peptídeo purificado (**Figura 39 B**).

• Ac-SLAGNSIGLSH-NH₂ (XIX)

A **Figura 40.A** mostra o perfil cromatográfico do material bruto obtido. 100 mg deste foram purificados por RP-HPLC nas mesmas condições citadas para o peptídeo **XVIII**, gradiente linear: 20-50%B em 60 min. Obtivemos 61,69 mg de peptídeo purificado que foi

analisado por RP-HPLC empregando-se o mesmo sistema de solventes contendo TFA (Figura 40.B).



Figura 37: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XVI bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A), 40-60% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)



Tempo (min)

Figura 38: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XVII bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A), 40 - 60% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)



Tempo (min)

Figura 39: Perfis de RP-HPLC do peptídeo XVIII bruto (A) e purificado (B). Condições experimentais: coluna: Vydac C-18, fluxo: 1ml/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H₂O; gradientes lineares: 5-95% de B em 30 min (A), 20-40% de B em 20 min (B). (Abs = absorbância)





4.3.2. Comentários importantes

Sumika Kiyota

a) Deleção em síntese de peptídeos em fase sólida

A formação de peptídeos que apresentam deleções de resíduos de aminoácidos

durante SPPS ocorre quando uma reação de acoplamento não se completa, o que leva à presença de mais de um grupo amina livre para reagir quando na próxima etapa de acoplamento. Na reação de acoplamento subsequente, esses grupos amina podem ser acilados, levando ao elongamento das cadeias peptídicas, de forma que uma delas apresenta deleção de um resíduo e a outra é a desejada, como ocorreu com o Peptídeo **X**.

Isto acontece muito frequentemente na síntese em fase sólida (Stewart & Young, 1984). Quanto maior e mais complexo for a seqüência do peptídeo a ser obtido, maior a probabilidade de que tais problemas ocorram. Na tentativa de se evitar a formação de subprodutos que apresentam deleções de resíduos tem sido investigadas várias possibilidades experimentais de maximizar a eficiência dos acoplamentos. Dentre elas pode-se citar a troca de solvente de reação, a troca do reagente acoplante e o aumento de temperatura (Varanda & Miranda, 1997). Frequentemente, o procedimento adotado nos casos em que os testes de ninidrina continuam indicando reação de acoplamento incompleta, mesmo após duas tentativas de reacoplamento, tem sido realizada a terminação de cadeias em crescimento através da acetilação. Este procedimento deve ser empregado com cautela. No caso de peptídeos longos, repetidas acetilações podem levar ao ponto em que nenhuma das cadeias peptídicas ligadas à resina possam mais ser elongadas (Stewart & Young, 1984; Bodanszky, 1993).

Em geral, os peptídeos que apresentam deleção de apenas um resíduo são quase impossíveis de serem separados devido à sua enorme similaridade em termos de comportamento cromatográfico. Em nosso caso, fomos bem sucedidos em alguns casos possivelmente por tratar-se de um peptídeo de tamanho médio e pelo fato de adotarmos um procedimento de purificação extremamente criterioso, mesmo se comparado aos geralmente empregados em laboratórios de síntese de peptídeos. Por exemplo, desenhamos os gradientes a serem empregados, considerando não apenas o componente majoritário, mas também levando em conta aqueles contaminantes de comportamentos próximos ao dele. Além disso, fizemos cortes manuais ao invés de utilizar coletores de fração, o que torna a purificação muito mais eficiente. O resultado foi a separação eficiente de produtos de comportamento cromatográfico quase que idêntico.

b) Ciclização de peptídeos através da formação de pontes dissulfeto

Como já citado na Introdução, existem diversos procedimentos de ciclização de peptídeos sintéticos. Obviamente que a sua escolha determina a estratégia a ser empregada para a construção de cadeia peptídica a ser ciclizada, Optamos inicialmente, pela ciclização por oxidação de grupos sulfidrilas de cisteínas pelo oxigênio do ar (Rivier et al., 1978) ou por K_3 Fe(CN)₆ (Misicka & Hruby, 1994).

A ligação dissulfeto é um elemento estrutural natural presente em um grande número de proteínas e peptídeos nativos. Este tipo de ligação posiciona os carbonos alfa dos resíduos de cisteína a uma distância de aproximadamente 6,5 Å (medida obtida por modelagem molecular). Esta distância parece favorecer as interações intramoleculares características de estruturas beta entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos vizinhos, sendo portanto, um elemento de restrição da conformação dessas moléculas (Creigthon, 1992).

O método de oxidação dos grupos sulfidrilas de cisteínas escolhido inicialmente foi

aquele em que a reação ocorre em presença do oxigênio do ar. Como já citado, tal oxidação se caracteriza pela sua simplicidade e por ocorrer em condições muito brandas, próximas às fisiológicas. Quando necessário, é possível aumentar a velocidade desta reação através do aumento da temperatura da solução de peptídeo para 40 - 60°C por algumas horas.

Em presença de ferricianeto de potássio, que é um oxidante mais forte que o O₂ do ar, a reação de oxidação se completa em menos de 2 horas, o que se constitui na principal vantagem deste procedimento. Entretanto, esta não é recomendada para a ciclização de peptídeos que possuam triptofano ou metionina em suas estruturas primárias devido à possibilidade de oxidação de suas cadeias laterais (Misicka & Hruby, 1994). Além disso, este método requer ainda uma etapa adicional de passagem de ~1L da solução de peptídeo por uma coluna de troca iônica para a remoção dos íons Fe²⁺, processo este, às vezes, trabalhoso e demorado.

A eficiência das reações de oxidação por nós realizadas mostrou ser mais dependente da sequência de cada peptídeo do que propriamente do método de ciclização empregado. Alguns peptídeos foram eficientemente oxidados por Q_2 do ar, enquanto que para outros o rendimento de ciclização por K_3 Fe(CN)₆ foi bastante superior. Em termos de qualidade, observou-se que a pureza do peptídeo bruto obtida pela oxidação por Q_2 do ar foi superior àquela obtida por oxidação com K_3 Fe(CN)₆. Por esta razão, testamos condições experimentais alternativas que pudessem levar a melhores rendimentos, ao aumento da qualidade dos peptídeos cíclicos obtidos ou, ainda, à recuperação do peptídeo por reoxidação das sulfidrilas Wandelan et al., 1989).

É importante esclarecer que embora os peptídeos cíclicos contendo ligação dissulfeto sejam bastante estáveis, os mesmos estão sujeitos a possível degradação por proteases quando em condições fisiológicas, o que não ocorre com aqueles que possuem ligação covalente do tipo lactama (Chorev et al., 1991). Por este motivo, empregamos este tipo de ciclização para os peptídeos **VIII** e **IX**. Esta ciclização é feita com o peptídeo ainda ligado à resina e monitorada por um rápido teste de ninidrina. A mesma dispensa a etapa de concentração por rota-evaporação de grandes volumes de soluções contendo os peptídeos cíclicos brutos (Felix et al., 1988), que pode levar a perdas e contaminações.

c) Separação entre os dois componentes ainda presentes no peptídeo IV purificado

Como já descrito, o peptídeo **IV** havia sido obtido e purificado por RP-HPLC até a homogeneidade em sistema TFA. A análise deste por espectrometria de massas, entretanto, evidenciou a presença de um contaminante residual de massa molecular de 1.249, que corresponderia a um peptídeo apresentando deleção do resíduo de asparagina. Da mesma forma, a análise da composição de aminoácidos do hidrolisado do peptídeo **IV** purificado mostrou que um valor observado para o resíduo de asparagina foi muito mais baixo do que o esperado. Duas estruturas distintas foram também detectadas na análise preliminar do peptídeo **IV** por ¹H-RMN, confirmando a presença de dois componentes distintos no material purificado. Diante destes resultados, passamos a determinar novas condições de RP-HPLC que possibilitassem a separação entre o peptídeo correto e este contaminante. Após diversas

tentativas, fomos bem sucedidos encontrando as seguintes condições para a separação dos mesmos a partir de cêrca de 4,0 mg de material:

<u>Solventes</u>: **Sistema 1** - Solvente A: TEAP (H_3PO_4 7,73 mL/L; TEA 6,27 mL/L; pH ~2,05 préviamente purificada por passagem cromatográfica em uma coluna Vydac C18; Solvente B: 60% ACN/TEAP. **Sistema 2** - Solvente A: 0,1% TFA; Solvente B: 60% ACN/0,09% TFA em H_2O .

<u>Gradientes</u>: 15 a 45% de solvente B em 30 min (Sistema 1) e de 30 a 55% de solvente B em 20 min (Sistema 2).

Coluna: Vydac C18 semi preparativa, fluxo de 3 mL/min e comprimento de onda de 220 nm.

Os dois componentes foram separados e analisados individualmente por RP-HPLC (Esquema 5; Figura 21).

Os dados da composição de aminoácidos estão mostrados na **Tabela 16** e demonstraram que o contaminante **V** era o peptídeo desejado **IV** e que apresentava deleção de um resíduo de asparagina.

Mesmo nestas condições, devido à pequena quantidade de peptídeo disponível, não foi possível obter o peptídeo V com grau de pureza superior a 86,0%. IV e V foram testados separados e em conjunto quanto às atividades mitogênicas.

Tabela 16: Composição de aminoácidos nos peptídeos V e IV

Peptídeo V: Asn/Asp: 0,00 (1,0); Glu: 1,00 (1,0); Phe:0,76 (1,0); His: 1.07 (1,0); Lys: 2,55 (3,0); Cistina: 0,54 (1,0). **Peptídeo IV:** Asn/Asp: 0,56 (1,0); Glu: 1,00 (1,0); Phe:0,61 (1,0); His: 0,97 (1,0); Lys:2,72 (3,0); Cistina: 0,4 (1,0).

Os valores obtidos foram normalizados em relação ao valor encontrado para o resíduo mais estável da sequência (nestes casos, Glu, presente em todos os peptídeos analisados).

d) Análise de aminoácidos

Os valores muito inferiores ao esperado para o resíduo de lisina, particularmente em frações provenientes da purificação dos peptídeos **XV** (fração secundária) e **VIII** (frações 2 e 3), nos levaram a suspeitar que poderia ter ocorrido deleções deste resíduo nos peptídeos, o que foi confirmado posteriormente por espectrometria de massas.

Os resultados da análise de V e IV, separados por RP-HPLC, comprovam que os valores extremamente baixos obtidos anteriormente para o resíduo de asparagina no peptídeo IV eram devidos à contaminação com V, que não possui este resíduo em sua sequência (Tabela 16). Os valores encontrados para este resíduo no peptídeo IV, mesmo após o processo de separação, ainda continuaram mais baixos do que o esperado, o que deve ser devido ao fato de que o mesmo ainda contém o seu contaminante.

Como pode ser observado nos resultados das análises da composição molar de aminoácidos nos peptídeos mostrados acima, de maneira geral os resíduos Glu/Gln, Asn/Asp e Lys apresentaram valores baixos em relação aos esperados.

A hidrólise ácida com HCI 6N degrada os resíduos de Met, Cys e Trp e, por isso, foram obtidos baixos valores para Met e Cys e não foi detectado o Trp. Nas condições experimentais

empregadas também ocorrem perdas parciais de Tyr e Ser.

Cientes dessas limitações do método empregado, também caracterizamos os compostos obtidos por espectrometria de massas.

e) Espectrometria de massas

A interpretação dos resultados de espectrometria de massas requer alguns conhecimentos anteriores sôbre as caracteristicas da amostra analisada e söbre o método empregado para a análise. A presença de mais de um pico do íon molecular em um espectro de um peptídeo cíclico bruto pode indicar a presença não somente de monômeros cíclicos, mas também de monômeros lineares, dímeros, oligômeros e de contaminantes de outra natureza. A presença de vários picos em um espectro de um peptídeo cromatograficamente homogêneo (pelo menos em dois sistemas de solventes diferentes) pode, por outro lado, ser decorrente de diferentes ionizações do mesmo composto: M⁺, M⁺+H⁺, M⁺+2H⁺, M⁺+nH⁺, M⁺+Na⁺, M⁺+2Na⁺, etc. É o que ocorre quando se utiliza espectrometria de massas por eletrospray (ESI-MS; Siuzdak, 1996).

De posse destes conhecimentos e por análise das diferenças de massas entre dois picos, identificamos os produtos desejados e boa parte de seus contaminantes.

Em relação aos peptídeos acima, no caso específico da fração secundária do peptídeo **XV**, a diferença entre a massa esperada (1546,1) e a observada (1418,4) corresponde exatamente à massa de um resíduo de lisina (146 - 1 H do N alfa - 10H do C alfa= 128). Os picos íon moleculares dos peptídeos determinados por espectrometria de massa foram os seguintes: Peptídeo **V**: 1249,0 (1249,0), Peptídeo **IV**: 1361,2 (1361,0) e Peptídeo **IX**: 1352,0 (1355,5). O espectro do peptídeo **V** mostra o íon molecular correspondente a ele e evidencia a presença de um componente único e isolado da mistura. O íon molecular correspondente ao **IV** mostra que este é o componente majoritário, pois o seu contaminante aparece em uma proporção bem menor do que aquela detectada.

4.4. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

4.4.1. Atividade mitogênica dos peptídeos sintéticos

Os ensaios de atividade mitogênica são de longa duração (~7 dias), bastante complexos e de difícil controle. Por esta razão, os resultados podem apresentar uma grande variablidade. A simples mudança do lote de soro bovino fetal ou de algum reagente ou mesmo o uso de diferentes alíquotas de células leva a variações na resposta celular.

Para controlar tal variabilidade, utilizamos diversos controles para cada experimento e estabelecemos procedimentos rígidos de cultivo, manutenção, repique e utilização de culturas provenientes de uma mesma alíquota de células (no máximo por 2 meses consecutivos). Além disso, durante os ensaios, tivemos o cuidado de adicionar às células cada uma das soluções de peptídeo, em concentrações variáveis e em duplicata ou triplicata.

A variabilidade observada entre os resultados dessas duplicatas ou triplicatas, em cada um dos ensaios, foi de ~20%, mesmo quando as condições experimentais foram

totalmente controladas. Os resultados obtidos em cada ensaio foram analisados separadamente, sem cálculos estatísticos. O conjunto de dados obtidos nas repetições dos testes forneceu uma tendência de comportamento de um peptídeo quanto à sua atividade (inibição, ativação ou nenhum efeito) em relação aos fibroblastos empregados. Por esta razão, a atividade mitogênica observada para um peptídeo (ou grupo de peptídeos sintéticos) estão apresentadas na forma de gráficos que mostram a curva de dose *versus* resposta obtida em um único experimento representativo do conjunto de testes realizados (sem quaisquer cálculos do grau de dispersão de cada ponto).

Um panorama geral dos resultados das atividades biológicas dos peptídeos sintéticos testados está mostrado na **Tabela 17**. Os detalhes e comentários sobre os resultados são apresentados a seguir.

Tabela 17: Resumo dos resultados dos ensaios de atividade mitogênica (A) e da medida das capacidades de ligação à resina de HEP-Sepharose (B) e de inibição da ligação de ¹²⁵—hFGF-1 e ¹²⁵—hFGF-2 aos receptores celulares (C).

		Α	В	С
Peptídeo	Seqüência	(ED₅₀ uM)	[NaCI](M)	ID₅₀ (uM)
- 11	AC-HAEKNWF-NH2	inativo (>200)	ND	>1000
111	Ac-SKKHAEKNWF-NH ₂	inativo (>200)	0,41	>1000
IV	c(1-5) [Ac-CKKHCEKNWF-NH ₂]	ativo (50)	0,39	~30
V	c(1-5) [Ac-CKKHCEKWF-NH ₂]	ativo (<100)	ND	ND
VI	Ac-SKKHA-NH ₂	inativo (>200)	ND	ND
VII	c(1-5) [Ac-CKKHC-NH ₂]	inativo (>200)	ND	ND
VIII	c(6-14) [Ac-SKKHAEKNWFVGLKK-NH ₂	ND	ND	ND
IX	c(1-5) [Ac-DKKHXEKNWF-NH ₂	inativo (>200)	ND	ND
1 I I	Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH ₂	ativo (60)	0,73	~30
X	Ac-WFVGLK-NGSSKRGPRT-NH ₂	ativo (<100)	0,64	~15
XVI	Ac-WFVGLKANGSSKRGPRT-NH2	ativo (60)	ND	ND
XVII	Ac-WFVGLAKNGSSKRGPRT-NH ₂	ativo (60)	ND	ND
XI	Ac-WFVGLPSKR-NH ₂	inativo (>200)	0,51	>1000
XII	C(4-7) [Ac-WFVCLPCKR-NH ₂	ativo (30)	ND	ND
XIII	c(3-7) [Ac-WFCGLPCKR-NH ₂	inativo (>200)	ND	ND
XIV	AC-WFVGLPSKRGPRT-NH ₂	inativo (>200)	0,41	>1000
XV	c(3-13[Ac-WFCGLPSKRGPRC-NH ₂	ativo (120)	ND	ND
	Ac-NTTDKENEVLH-NH2	inativo; inibe FGF-2 ²	ND	>100
XIX ¹	Ac-SLAGNSIGLSH-NH ₂	inativo (>1000) ²	ND	>100

Os valores de ED_{50} foram determinados a partir de curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações de cada peptídeo (segundo protocolo descrito por Armelin e col, 1973). Os peptídeos **XVIII** e **XIX** foram pré-incubados com FGF-1 ou FGF-2 (2 ng/mL) (Oyama et al., 1999). A capacidade de ligação à heparina-Sepharose está expressa em termos de concentração de NaCl necessária para eluir o peptídeo da coluna (1,5 M NaCl para eluir 2 ng de FGF-1). Os valores de ID₅₀ foram determinados a partir dos ensaios de inibição da ligação de I¹²⁵ [FGF-1] (Kan e col., 1991).¹ - peptídeos derivados do FGFR; ² - atividade mitogênica determinada pela adição dos peptídeos sozinhos ou pré-incubados com hFGF-1 ou hFGF-2 à cultura de células; ND – não determinado.

a) Atividade mitogênica dos peptídeos sintéticos derivados do sítio 2 do hFGF-1

Peptídeos II e III:

Os peptídeos Ac-HAEKNWF-NH₂ (II) e Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (III) foram testados repetidas vezes quanto às suas atividades, utilizando-se as mesmas preparações de peptídeos diluídos em PBS na presença ou ausência de albumina e descongelando-se lotes diferentes da mesma célula. A realização destes ensaios repetidas vezes permitiu constatar que, de fato,

existe uma variabilidade inerente à própria célula relacionada com o tempo de cultura, ainda que elas sejam mantidas nas mesmas condições e utilizando-se o mesmo protocolo. Assim, o conjunto de resultados foi analisado, como mencionado acima, sem cálculos estatísticos, e forneceu uma tendência média de comportamento quanto à atividade mitogênica desses peptídeos. Conforme mostrado na **Tabela 17**, os resultados obtidos nesses ensaios demonstraram que esses peptídeos não são mitogenicamente ativos e não inibem a atividade do FGF-1 na faixa de concentração empregada (0-200µM).

Peptídeos I e X:

Os experimentos com os peptídeos Ac-WVFGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ (I) e Ac-WFVGLKNGSSKRSKRGPRT-NH₂ (X), que foram testados numa faixa de concentração de 0 a 200 ug/mL, estão mostrados na **Figura 41**.

A resposta mitogênica do peptídeo I atingiu 19% quando este foi adicionado à cultura de células na concentração de 200 ug/ml (correspondentes a 102,4 μ M do peptídeo). O hFGF-1 usado como controle, na concentação de 10 ng/mL (correspondentes a 6 x 10⁻⁴ μ M de FGF-1), exibiu uma porcentagem de resposta de 9,7%. Concluímos, portanto, que este peptídeo era de fato ativo, confirmando o resultado descrito anteriormente (Oyama et. al.,1996). Exibindo um ED₅₀ de aproximadamente 60 μ M, este peptídeo I passou a ser uma referência nos ensaios de atividade mitogênica que se seguiram (**Tabela 17**).

O peptídeo X, um análogo que apresenta deleção de uma lisina em relação ao peptídeo I, mostrou ser também capaz de induzir a síntese de DNA em cultura de fibroblastos em níveis comparáveis àqueles exibidos por I: uma resposta de 12,4% quando a concentração foi de 100 ug/mL (correspondentes a 55 μ M do peptídeo X). O peptídeo X alcançou um platô de atividade máxima a partir desta concentração, sendo a amplitude de resposta mitogênica, porém, muito menor do que a exibida pelo peptídeo I (Tabela 17). Este resultado é bastante interessante, pois indica que apenas um dos resíduos de Lys presentes é suficiente para a atividade, possibilitando o envolvimento de um desses resíduos nas ciclizações.

Tendo em vista que o peptídeo I foi capaz de ligar-se à coluna de heparina-Sepharose (Oyama et al., 1996) mas não teve sua atividade mitogênica potenciada por heparina, resolvemos testar a atividade mitogênica do seu análogo, o peptídeo X, em presença de heparina 10 µg/mL. Os resultados deste teste estão mostrados na **Figura 42**. Estes sugerem que a heparina potencia a atividade mitogênica exibida pelo peptídeo X em concentrações menores do que 30 µg/mL do mesmo. Na mesma faixa de concentrações de peptídeo, a atividade de I não é potenciada significativamente. Essa diferença pode ser devida ao fato de que o peptídeo X (des [Lys]-Pep I) não apresenta uma das lisinas da sequência [...LKKN..] presente no peptídeo I. No FGF-1 este resíduo é descrito como envolvido na ligação à heparina (Thompson et al. 1994).



Figura 41: Curva dose versus resposta da atividade mitogênica dos peptídeos I e X sôbre fibroblastos Balb/C 3T3, clone A31. Os valores são expressos em % R e correspondem à atividade mitogênica dos peptídeos em relação àquela observada com FCS 10% (100 de %R). O FGF1 usado como controle apresentou uma atividade de 10,3 de % R na concentração utilizada (10 ng/mL).



Figura 42: Curva dose versus resposta da atividade mitogênica dos peptídeos I e X sôbre fibroblastos Balb/C 3T3, clone A31, na presença de 10 mg/mL de heparina. Os valores são expressos em % R e correspondem à atividade mitogênica dos peptídeos em relação àquela observada com FCS 10% (100 de %R). O FGF1 usado como controle apresentou uma atividade de 10,3 de % R na concentração utilizada (10 ng/mL).

Peptídeos I, III, IV, X, XI e XIV:

Os resultados dos ensaios de atividade mitogênica dos peptídeos I, III, IV, X, XI e XIV estão representados em conjunto no gráfico da **Figura 43**. Podemos observar que, na faixa de 0-200μM, o peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] (IV) apresentou uma atividade mitogênica similar (ED₅₀ ~60 μM) a do peptídeo I de referência. Na mesma faixa de concentrações, o seu análogo linear peptídeo Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (III), mostrou ser totalmente inativo. Tais resultados se mostraram bastante intrigantes, pois os peptídeos III e IV apresentam uma similaridade estrutural entre si no que diz respeito ao "core" hidrofóbico WF[V] (considerado como essencial para a atividade do peptídeo I; Oyama et al., 1996). A análise conformacional teórica do peptídeo III mostrou que este era mais flexível que o cíclico (IV), o que poderia explicar o fato de o mesmo não ser ativo. Por outro lado, as conformações preferenciais adotadas pelo peptídeo cíclico IV nas simulações feitas por modelagem molecular, foram muito semelhantes àquela assumida pelo fragmento correspondente na proteína nativa. A restrição conformacional imposta pela ciclização deste peptídeo parece ter sido eficiente no posionamento correto do par de lisinas (KK) em relação ao "core" hidrofóbico (WF) o que, provavelmente, é importante também para a ligação com os receptores celulares.

Podemos observar ainda que a atividade do peptídeo **X** (que não possui um resíduo de Lys) foi bem menor, demonstrando que as duas lisinas adjacentes (KK) são essenciais para a atividade do peptídeo de referência (peptídeo I).

A **Tabela 17** e a **Figura 43** mostram que os peptídeos Ac-WFVGLPSKR-NH₂ (**XI**) e Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH₂ (**XIV**) são essencialmente inativos. A deleção do fragmento KKNGS e simultânea substituição deste por um resíduo de prolina que, sob o ponto de vista teórico, posicionam, adequadamente, os resíduos $K^{12}R^{13}$ próximos ao "core" hidrofóbico, não foram na prática bem sucedidos. Em resumo, estes resultados sugerem que: 1) o par de resíduos de lisina (K^6K^7) não é mimetizado por outro de mesma carga $K^{12}R^{13}$; 2) o fragmento KKNGS, presente nos peptídeos I e X, tem uma função estrutural que não é mimetizada pela prolina, 3) que não só a presença do "core" hidrofóbico WF(V), mas também o seu posicionamento espacial é importante para a atividade mitogênica de peptídeos da Região 2 do hFGF-1.



Figura 43. Curvas dose versus resposta da atividade mitogênica dos peptídeos I, III, IV, X, XI e XIV sôbre fibroblastos Balb/C, clone A-31. Os valores são expressos em %R e correspondem à atividade mitogênica dos peptídeos em relação àquela observada com FCS 10% (100% R).

Os resultados representados na **Figura 44** indicaram que as atividades mitogênicas dos peptídeos Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ (I) e c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] (IV) são semelhantes entre si, sendo estas parcialmente somadas quando estes compostos são adicionados simultâneamente às células. Portanto, o peptídeo I e IV devem ser agonistas do FGF-1 humano capazes de induzir a incorporação de timidina no DNA das células empregadas provavelmente, através da ligação aos mesmos receptores celulares.

Finalmente, a **Figura 45** mostra os resultados de atividade mitogênica obtidos para os dois componentes separados que coexistiam no material purificado em ACN/TFA referente ao peptídeo **IV** (descrito em síntese dos peptídeos em fase sólida da seção anterior). Fica claro que a atividade mitogênica descrita para este material era devida ao componente cíclico com a sequência primária correta. Como se pode observar, o componente que apresenta deleção de um resíduo de asparagina, o peptídeo c(1-5)[Ac-CKKHCEKWF-NH₂] (**V**), não exibe sózinho uma atividade mitogênica significativa sobre as células. Estes resultados: a) demonstram que o resíduo de asparagina é essencial para a atividade mitogênica do peptídeo **IV**; b) sugerem que a presença deste resíduo pode auxiliar na manutenção do distanciamento correto do par de lisinas (KK) a uma distância apropriada do "core" hidrofóbico constituído pelos resíduos de triptofano e fenilalanina (WF) como foi sugerido anteriormente por nós (Kiyota et al., 1997): a alteração do passo da cadeia peptídica provocada pela ausência da aparagina leva a uma

alteração do posicionamento das cadeias laterais dos resíduos essenciais para a atividade mitogênica.



Figura 44. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos I e IV separadamente e com a mistura de ambos em concentrações iguais.





Peptídeos XI, XII e XIII:

Os peptídeos cíclicos c(4-7) Ac-WFVCLPCKR-NH₂ (XII) e (3-7)Ac-WFCGLPCKR-NH₂ (XIII) foram testados em comparação com o análogo linear Ac-WFVGLPSKR-NH₂ (XI) (Figura 46). Podemos observar que apenas o cíclico XII mostrou ser mitogênico (ED₅₀ ~30 μM, Tabela 17). Se comparada a sua atividade com as aquelas dos outros peptídeos ativos obtidos por nós (I e IV), pode-se dizer que este é um agonista do hFGF-1 ligeiramente mais potente. Provavelmente, o posicionamento dos resíduos WF em relação a KR parece ser também adequado para a ativação de uma resposta celular.

Peptídeos XIV e XV:

A **Figura 47** mostra os resultados de atividade mitogênica obtidos para o peptídeo cíclico c(3-12) Ac-WFCGLPSKRGPRC-NH₂ (**XV**) em comparação com o seu análogo linear Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH₂ (**XIV**). O peptídeo **XV** mostrou ser mitogênico em concentrações superiores a 50 μM. A atividade exibida por este peptídeo foi crescente na faixa de 50 a 200 μM, apesar de baixa (ED₅₀ 120 μM, **Tabela 17**). Por outro lado, o análogo linear (peptídeo **XIV**) se mostrou essencialmente inativo. Estes resultados sugeriram que a orientação do anel formado em uma ciclização possa também ser fundamental para o posicionamento correto dos resíduos essenciais para a atividade. Provavelmente, como era desejado e ocorreu com o peptídeo **XII**, a ciclização do peptídeo **XV** restringiu a conformação de modo a melhor posicionar os resíduos essenciais à expressão da atividade mitogênica em termos de distância e orientação relativas.

Peptídeos IX e III:

Os resultados dos ensaios de atividade mitogênica realizados com o componente isolado e caracterizado por espectrometria de massas como sendo o peptídeo c(1-5)Ac-DKKHdbuEKNWF-NH₂ (**IX**) desejado foram reprodutíveis e demostraram que este e o seu análogo linear correspondente Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (**III**) não eram ativos na faixa de concentração testada (**Tabela 17**). Foram obtidos valores basais de contagem de radioatividade e, por isso, não mostramos a curva dose-resposta obtida. Como já descrito, o peptídeo **IX** foi concebido como um análogo de **IV** que deste diferia apenas quanto ao tipo de restrição conformacional introduzida: uma ligação lactama que o tornaria quimicamente mais estável do que o **IV**.



Figura 46. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos XII, XIII e XI. FGF-1 (1,0 ng/mL- 9389 cpm). PBS - (1990 cpm).



Figura 47. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos XV e XIV. FGF-1 (1,0 ng/mL- 7251 cpm). PBS (2229 cpm).

Peptídeos XVI e XVII:

Ac-WFVGLKANGSSKRGPRT-NH₂ (XVI)Os peptídeos Ace WFVGLAKNGSSKRGPRT-NH₂ (XVII) foram sintetizados como análogos do peptídeo I e apresentam substituição de uma das lisinas adjacentes (K⁶K⁷) por alanina. Os ensaios de atividade mitogênica com estes peptídeos poderiam fornecer novos esclarecimentos sobre os requisitos estruturais necessários para esta atividade em peptídeos derivados dessa região da proteína. Os testes de atividade mitogênica realizados mostraram que estes compostos exibem atividades comparáveis àquela exibida por I ($ED_{50} \sim 60 \mu M$, **Tabela 17** e **Figura 48**). Estas atividades foram maiores do que a exibida pelo peptídeo X, que apresenta deleção de uma das lisinas. Estes resultados sugerem que, mantida a orientação relativa dos outros resíduos na seguência (passo da seguência peptídica) apenas uma das lisinas adjacentes do peptídeo I é essencial para a sua atividade mitogênica.



Figura 48. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada (cpm) no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A31, estimulados com diferentes concentrações dos peptídeos **XVI** e **XVII**. FGF-1 (1,0 ng/mL- 7251 cpm) . PBS (2229 cpm).

b) Determinação da atividade dos peptídeos derivados da seqüência primária do domínio DIII do FGFR1-**b**

Os ensaios de atividade mitogênica dos peptídeos Ac-NTTDKENEVLH-NH₂ (**XVIII**) e Ac-SLAGNSIGLSH-NH₂ (**XIX**), que possuem sequências derivadas do domínio extracelular DIII da isoforma 1β do FGF (FGFR-1β), foram realizados na ausência e em presença de hFGF-1 (2 ng/mL) utilizando culturas de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A31, semi-confluentes. Sozinhos, estes peptídeos não foram capazes de induzir a incorporação de timidina triciada no DNA de fibroblastos A31 sub-confluentes. As contagens de radioatividade obtidas para concentrações de peptídeo que variaram de 0 a 100 uM foram muito próximas àquela obtida pelo controle negativo (PBS). Esses resultados demonstraram que os mesmos não são mitogênicos no intervalo de concentrações testado. Por isto, não são apresentados gráficos dose-resposta.

Variações no protocolo experimental de determinação da atividade mitogênica foram também testadas (Oyama et al., 1999). Inicialmente, adicionamos cada um destes peptídeos e o hFGF-1 à cultura de células simultaneamente. Os resultados obtidos mostraram que, ainda assim exibiram atividades mitogênicas muito pouco significativas. Devido a este fato e à conhecida alta afinidade do hFGF-1 pelos seus receptores celulares, concluímos que o efeito inibitório esperado não foi verificado por causa da adição simultânea hFGF-1 e peptídeo à cultura de células. Sendo assim, pré-incubamos estes peptídeos em diferentes concentrações com os hFGF-1 e hFGF-2 (2,0 ng/mL), por 15 min a 37°C antes de suas adições à cultura de fibroblastos. A **Figura 49** mostra um claro efeito inibitório do peptídeo **XVIII** nas atividades mitogênicas tanto do FGF-1 quanto do FGF-2, com discreta preferência pelo segundo. Nas mesmas condições, o peptídeo **XIX** não apresentou qualquer efeito inibitório na atividade das duas proteínas (**Figura 50**).


Figura 49. Curvas dose da versus resposta incorporação de timidina tritiada no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações do peptídeo XVIII préincubado) com FGF-1 (2 ng/mL-34820 cpm) ou com FGF-2 (2 ng/mL- 48241 cpm).



Figura 50. Curvas dose versus resposta da incorporação de timidina tritiada no DNA de fibroblastos Balb/c 3T3, clone A-31, estimulados com diferentes concentrações do peptídeo *XIX* préincubado com FGF-1 (2 ng/mL-22012 cpm) ou com FGF-2 (2 ng/mL- 20187 cpm).

4.4.2. Ensaios de incorporação de BrDU com os peptídeos I e IV

As atividades mitogênicas exibidas por I e IV foram corroboradas por resultados de ensaios de incorporação de BrDU no DNA dos fibroblastos. Como já descrito, a quantificação desta incorporação foi conseguida através da análise das células tratadas com os peptídeos, em microscópio de fluorescência, o que nos possibilitou determinar a percentagem de células marcadas com anti-BrdU-FITC.

Podemos observar pelos resultados da **Tabela 18**, que os peptídeos I e IV (200 µg/mL) foram capazes de estimular células sub-confluentes carenciadas a entrarem na fase S do ciclo celular com incorporação de BrDU em seus DNAs. As células que foram estimuladas pelos peptídeos foram reveladas após o tratamento com anti-BrdU-FITC e contadas. Os resultados de atividade mitogênica estão expressos em porcentagens das células que entraram em fase S após cada tratamento e a potência dos mesmos em relação ao controle não tratado com peptídeo e lavado com PBS.

com os peptideos m e vi: imunonuorescencia maireta							
Tratamento	% de núcleos	Tratado/					
	marcados*	Controle lavado					
	6,5	4,3					
IV	9,8	6,5					
FGF-1	8,0	5,3					
FCS 10%	76,7	51,1					
Controle lavado	1,5	-					

 Tabela 18: Incorporação de BrdU no DNA de fibroblastos A-31 estimulados

 com os peptídeos III e VI: Imunofluorescência indireta

* Cerca de 1000 células foram observadas para cada tratamento, escolhendo-se campos microscópicos ao acaso.

4.4.3. Ensaios de inibição da ligação do ¹²⁵I-HFGF-1 aos seus receptores celulares em presença dos peptídeos sintéticos

a) Peptídeos derivados da sequência primária do hFGF-1:

A capacidade dos peptídeos I, III, IV, X, XI e XIV de inibir a ligação dos ¹²⁵I-hFGF-1 e ¹²⁵I-hFGF-2 aos receptores presentes nos fibroblastos 3T3 de camundongos Balb/C, clone A 31, foi também determinada. A atividade específica do ¹²⁵I-FGF-1 obtido pela iodinação do FGF-1 humano recombinante ficou entre 39.000-53.000 cpm/ng e a dose desta proteína a ser empregada nos ensaios foi determinada previamente, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos. As doses sub-saturantes de ¹²⁵I-FGF-1 determinadas em cultura de fibroblastos variaram em torno de 18 a 20 ng/mL.

Os resultados obtidos nestes ensaios estão mostrados na **Tabela 17** (coluna **C**). Como se pode observar, o peptídeo **IV** foi capaz de inibir a ligação do ¹²⁵I-FGF-1 aos receptores celulares presentes nos fibroblastos. Assim como o peptídeo **I** de referência, este apresentou um ID₅₀ de ~30 μ M. O mesmo não ocorreu com os peptídeos **III**, **XI** e **XIV**, corroborando o dado de que eles não são mitogênicos.

O peptídeo **X**, por outro lado, embora apresentando uma atividade mitogênica muito baixa, foi capaz de também inibir, de forma significativa, a ligação do ¹²⁵I-FGF-1 aos seus receptores celulares (ID₅₀ ~15 μ M). Como foi dito anteriormente, a única diferença estrutural deste análogo em relação ao peptídeo de referência (I) é a ausência de uma lisina (K⁷).

Apesar de resultantes de medidas indiretas, os dados acima sugeriram que I, IV e X podem estar competindo com os FGF-1 e -2 humanos pela ligação aos FGFR-1 β presentes nos fibroblastos empregados.

b) Peptideos XVIII e XIX derivados do domínio DIII do receptor FGFR-1b

Investigamos também se os peptídeos **XVIII** e **XIX** eram capazes de inibir a ligação do hFGF-1 e hFGF-2 aos receptores celulares presentes nos fibroblastos 3T3 de camundongos Balb/C, clone A31. Esta investigação era dispensável, mas decidimos fazê-la apenas para confirmar os resultados descritos no item 4.4.1.b.

As atividades específicas dos ¹²⁵I -FGF-1 e ¹²⁵I -FGF-2 obtidos pela iodinação dos FGF-1 e FGF-2 humanos recombinantes foram de ~39.000 cpm/ng e ~13.000 cpm/ng, respectivamente. As doses sub-saturantes destas proteínas marcadas foram determinadas previamente em culturas das mesmas células tal como descrito em Materiais e Métodos. A dose sub-saturante do ¹²⁵I -FGF-1 assim obtida foi de 18,0 ng/mL, enquanto que a do ¹²⁵I -FGF-2 foi de 17,8 ng/mL. Como controle, as ligações inespecíficas foram também determinadas incubando-se ¹²⁵I-FGF-1 (18,0 ng/mL) em presença de 2 µg/mL de FGF-1 não marcado e, da mesma forma, incubando-se ¹²⁵I-FGF-2 (17,8 ng/mL) em presença de 2 µg/mL de FGF-2 não marcado. O valor obtido foi subtraído de todos os encontrados nos ensaios de competição.

Como esperado, os resultados de ID_{50} obtidos nesses ensaios foram sempre superiores a 100 μ M (**Tabela 17**).

Comparando-se os resultados obtidos com estes dois peptídeos e os dados descritos na literatura a respeito dos domínios de cada um dos componentes envolvidos na interação entre FGF-FGFR-HEP (Oyama et al., 1997; Digabriele et al., 1998; Venkataraman et al., 1999;

Wang et al., 1999) e tendo em vista: 1) o fato de que as sequências primárias destes peptídeos se originam de regiões distintas do domínio DIII do receptor FGFR-1 ß (XVIII e XIX possuem sequências primárias relacionadas às das alças DE e FG do receptor, respectivamente); 2) o fato de que estas alças foram sugeridas como os prováveis domínios do receptor que ligam o sítio 2 dos FGF (Gray et al., 1993, Bottaro et al., 1993; Kan et al., 1996; Oyama et al., 1999); 3) apesar de o sítio 2 ser um sítio secundário de ligação ao receptor e, portanto, possuindo muito menor afinidade pelo receptor do que o sítio primário (Sítio 1, cuja afinidade foi 250 x maior do que a sítio 2, Springer et al., 1994), este sítio 2 parece estar envolvido com as especificidades dos diferentes FGFs em ligar, específica e seletivamente, determinada isoforma de FGFR (Blaber et al., 1996); de outro lado, o domínio das diferentes isoformas de FGFR que ligam especificamente determinados FGFs parece estar localizado no DIII (Gray, 1993, Bottaro, 1993; Kan et al., 1996). Estes fatos poderiam explicar a baixa capacidade inibitória do peptídeo XVIII e sua baixa afinidade pelos FGF-1 e 2. Já o fato de que o peptídeo XIX é inativo enquanto o XVIII inibe mais especificamente o FGF-2 parece ser indicativo de que a interação entre esta proteína e o receptor poderia estar ocorrendo em uma orientação espacial que envolve o loop DE do FGFR como no modelo de interação recentemente proposto para o FGF-2 e o seu receptor (Venkataraman et al., 1999).

4.4.4. Ensaio de ligação dos peptídeos I, III, IV, X, XI E XIV a coluna de heparinasepharose

Como foi dito anteriormente, os FGFs apresentam uma grande afinidade à heparina. Essa propriedade tem sido utilizada para a purificação dos mesmos em colunas de HEP-Sepharose (Shing et al., 1984). Os domínios de ligação do hFGF-1 à heparina estariam localizados na região que contém o Sítio 2 desta proteína (Pantoliano et al., 1994, Imamura et al., 1995, Sieber & Moe, 1996). Assim, alguns dos peptídeos derivados dessa região da proteína sintetizados neste projeto foram testados quanto às suas afinidades pela heparina através de medidas da capacidade de ligação a colunas de HEP-Sepharose.

Os peptídeos testados foram: Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ (I), Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (III), ciclo(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] (IV), des-Lys-[I] (X), Ac-WFVGLPSKR-NH₂ (XI) e Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH₂ (XIV). As concentrações de NaCI necessárias para a eluição desses peptídeos foram determinadas a partir da curva padrão de NaCI e os resultados estão mostrados na **Tabela 17**.

Foi observado que 1 ml da resina heparina-Sepharose inchada é capaz de ligar cerca de 2 mg de hFGF-1, sendo este eluído da coluna somente quando se emprega soluções de NaCl/Tampão fosfato 10 mM, pH 7,2, contendo NaCl em concentrações superiores a 1,5 M. Já os peptídeos testados são eluídos com solução de concentrações de NaCl inferiores a 1 M. Em outras palavras, os resultados demonstraram que **I**, **III**, **IV**, **X**, **XI** e **XIV** possuem uma certa afinidade por heparina que, entretanto, é menor que a do hFGF-1.

Esta baixa afinidade pode ser explicada pelo fato de que os mesmos possuem resíduos básicos, mas não possuem todos os resíduos importantes para a ligação com tal poliânion.

É interessante notar que os peptídeos I e X tem afinidade maior pela resina quando

comparada aos demais peptídeos. A afinidade ligeiramente maior demonstrada pelo peptídeo **XI** em relação ao **XIV**, evidencia uma importância relativa menor do resíduo R13, ausente no peptídeo **XI**. Ao contrário, quando comparamos suas afinidades com as dos peptídeos **I** e **X**, fica evidente que o resíduo K12 presente nestes peptídeos tem participação importante nesta ligação, assim, como a tem na proteína (K118). É interessante observar também que **I** e **X** apresentaram a mesma afinidade de ligação à HEP-Sepharose. Entretanto, apenas **X** teve sua atividade mitogênica em cultura de fibroblastos 3T3 de camundongos Balb/C, clone A-31, potenciada por heparina exógena.

4.5. ESTUDO CONFORMACIONAL DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS EM SOLUÇÃO

4.5.1. Peptideos Ac-SKKHAEKNWF-NH₂(III) e c(1-5) Ac-CKKHCEKNWF-NH₂ (IV)

a) Medidas de dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear dos peptídeos III e IV

Com o intuito de encontrar possíveis diferenças estruturais que pudessem ser correlacionadas com a não atividade de **III** e a atividade mitogênica exibida por **IV** (item 4.4.1.), decidimos fazer uma análise conformacional destes peptídeos em solução. Essa análise foi realizada empregando-se as técnicas de CD e ¹H-RMN no laboratório do Dr. Alberto Spisni, Universidade de Parma, Itália. Parte dela foi feita durante um estágio de dois meses no referido laboratório.

Tendo em vista que a conformação ativa de um peptídeo deve ser induzida durante a sua interação com o receptor, vários experimentos foram realizados no sentido de se determinar as condições experimentais que pudessem revelar as capacidades intrínsecas dos peptídeos em adotarem estruturas ordenadas em solução.

Como era esperado para peptídeos curtos, os espectros de CD dos dois peptídeos em soluções aquosas tamponadas em diferentes pHs e a 20°C (**Figura 51**), não revelaram a presença de estruturas secundárias ordenadas estáveis. Estes resultados se mostraram independente da concentração do peptídeo em análise, o que nos permitiu descartar a possibilidade de ocorrência de agregação.

Para a obtenção dos espectros de CD mostrados na **Figura 52** adicionamos quantidades crescentes de MeOH às soluções de ambos os peptídeos. Como descrito anteriormente, este solvente é conhecido como um estabilizador de dobras (Liu & Deber, 1998). Povavelmente por isto, a sua adição promoveu um deslocamento da banda com elipticidade molar negativa de 198 nm para comprimentos de onda maiores e o aparecimento de um "ombro" em comprimento de onda próximo de 220 nm. Estes resultados sugeriram a presença de elementos de estruturas secundárias em III e IV, que incluem conformações helicoidais e/ou dobras (*turns*) mal definidos em curtos trechos das seqüências peptídicas.

Por esta razão, a mistura CD₃OH 50%/solução tampão fosfato foi também empregada na análise de III e IV por ¹H-RMN.



Figura 51: Espectros de CD de III (A) e IV (B) em função do pH. Condições experiementais: 0,01M de peptídeo en solução de tampão fosfato 5mM a 20ºC.



Figura 52: Espectros de CD de III (A) e IV (B) em função da variação da porcentagem de MeOH). Condições experiementais: 0,01M de peptídeo em solução de tampão fosfato 5mM, pH 6,0 a 20°C.

Os valores dos deslocamentos químicos dos prótons NH e CH determinados por ¹H-RMN dos peptídeos **III** e **IV** dissolvidos em uma mistura de solução tampão fosfato 5 mM:CD₃OH (1:1, v/v), pH~6,0 a 25 °C estão mostrados a seguir nas **Tabelas 19** e **20**.

As estruturas derivadas dos dados de RMN revelaram algumas peculiaridades estruturais significativas que diferenciam III de IV. Ambos apresentaram uma dobra em suas porções N-terminal, sendo esta muito melhor definida no peptídeo mitogênico IV (Figura 53). Esta dobra, entretanto, não se enquadra entre os tipos convencionais de dobra *b*, como pode ser indicado pela ausência de NOEs típicos que caracterizam os tipos conhecidos de dobras *b* ou ainda pela análise dos ângulos diedros $\phi \in \psi$.

Outras diferenças significativas entre **III** e **IV** foram encontradas nas porções Cterminal destes peptídeos. Tal porção do peptídeo **III** não mostrou nenhuma preferência conformacional (**Figura 53.A**). As várias estruturas do peptídeo **IV**, por outro lado, se agruparam em famílias com determinantes estruturais distintos. Muitas das estruturas selecionadas exibiram uma dobra γ na região His⁴-Glu⁶ (**Figura 53.B**). Outras exibiram uma dobra β do tipo II que se estende desde o Glu⁶ até o Trp⁹ (**Figura 54.A**). Também, foi detectada a presença de dobras helicoidais com diferentes orientações em relação à dobra Nterminal formada pela ponte dissulfeto (de E⁶ a W⁹). Um exemplo deste motivo helicoidal observado na porção C-terminal da estrutura do peptídeo **IV** está mostrado na **Figura 54.B**.

Para verificar se a presença deste motivo helicoidal observado estaria refletindo uma preferência estrutural intrínseca deste peptídeo, estudamos os efeitos da exposição de III e IV ao TFE (Sönnichsen et al., 1992; Shiraki et al., 1995). Os espectros de CD obtidos pela titulação das soluções de III e IV em tampão fosfato com o TFE (Figura 55) foram consistentes com uma helicidade aparente maior no peptídeo III, embora as bandas negativas características deste tipo de estruturas estivessem deslocadas para o azul. Tal observação sugere que a conformação estendida ainda predomina. Surpreendentemente, o peptídeo IV apresentou comportamento similar àquele observado em presença de MeOH. As estruturas tridimensionais derivadas de RMN do peptídeo mitogênico em presença de TFE foram, da mesma forma, bastante semelhantes às obtidas em presença de MeOH. Várias famílias de estruturas que obedecem as restrições de RMN foram identificadas.

A **Figura 56.A** mostra a presença de uma dobra na porção N-terminal do peptídeo **IV** sendo esta muito parecida com aquela observada em presença de MeOH. Dependendo das estruturas selecionadas, foi ainda observada uma preferência local do trecho His⁴-Glu⁶ ou Cys⁵-Lys⁷ do peptídeo em adotar conformações em dobra.

Resíduo	фн	$\mathbf{d}_{\mathbf{la}}$	đњ	d _{ig}	dutros
Ac	-	-	-	-	δCH ₃ 1,90
Ser ¹	8,22	4,35	3,85-3,77	-	-
Lys ²	8,38	4,32	1,84-1,84	-	H_{δ} 1,67; H ϵ 2,95
Lys ³	8,09	4,20	1,72-1,72	1,35	H_{δ} 1,65; H ϵ 2,93
His ⁴	8,33	4,65	3,24-3,12	-	H ² 8,60; H ⁴ 7,28
Ala⁵	8,32	4,29	1,36	-	-
Glu ⁶	8,23	4,35	1,91-2,06	2,40	-
Lys ⁷	8,21	4,19	1,61-1,61	1,25	H _δ 1,51; Hε 2,82; εNH 7,60
Asn ⁸	8,25	4,63	2,65-2,65	-	γNH ₂ 6,83-7,51
Trp ⁹	7,91	4,47	3,06-3,06	-	H ² 7,08; H ⁴ 7,51; H ⁵ 7,08; H ⁶
					7,14; H ⁷ 7,41; N ¹ H 10,16
Phe ¹⁰	7,71	4,45	2,81-2,94	-	H_{δ} 7,10; H_{ϵ} 7,27; H_{ζ} 7,27;
					NH ₂ -term 6,69

Tabela 19: Deslocamentos químicos (∎em ppm)ª dos prótons NH e CH contidos no peptídeo Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (III) determinados nos espectros de ¹H-RMN.

O peptídeo foi dissolvido em uma mistura de tampão fosfato 5 mM:CD₃OH (1:1, v/v), pH~6,0 a 25°C. ^a-valores de deslocamentos químicos em relação à ressonância da água (& 4,81ppm).

Resíduo	d ih	d ia	đњ	d₁ _g	doutros
Ac	-	-	-	-	δCH ₃ 1,97
Cys ¹	8,30	4,31	2,98; 3,13	-	-
Lys ²	8,86	4,35	1,74-1,85	-	H_{δ} 1,67; H ϵ 2,95
Lys ³	7,93	4,27	1,72-1,72	1,35	H_{δ} 1,65; H ϵ 2,93
His ⁴	8,76	4,48	3,24-3,12	-	H ² 8,60; H ⁴ 7,28
Cys ⁵	8,29	4,57	1,36	-	-
Glu ⁶	8,28	4,19	1,91-2,06	2,40	-
Lys ⁷	8,23	4,15	1,61-1,61	1,25	H _δ 1,51; Hε 2,82; εNH 7,60
Asn ⁸	8,20	4,58	2,65-2,65	-	γNH ₂ 6,83-7,51
Trp ⁹	7,90	4,44	3,06-3,06	-	H ² 7,08; H ⁴ 7,51; H ⁵ 7,08; H ⁶
					7,14; H ⁷ 7,41; N ¹ H 10,16
Phe ¹⁰	7,69	4,43	2,81-2,94	-	H_{δ} 7,10; Hε 7,27; H_{ζ} 7,27;
					NH ₂ -term 6,69

Tabela 20: Deslocamentos químicos (dem ppm)^a dos prótons NH e CH contidos no peptídeo c(1-5) Ac-CKKHCEKNWF-NH₂ (IV) determinados nos espectros de ¹H-RMN.

O peptídeo foi dissolvido em uma mistura de tampão fosfato 5 mM:CD₃OH (1:1, v/v), pH~6,0 a 25°C. ^a-valores de deslocamentos químicos em relação à ressonância da água (δ = 4,81ppm).



Figura 53: Estruturas tridimensionais dos peptídeos III (A) e IV (B) derivadas dos dados obtidos por 2D-¹H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/CD₃OH (1:1, v/v) a 25℃. A superposição das estruturas foi feita nos trechos: K2-H4 com RMSD de 0,91±0,25 Å para o peptídeo linear III; e K2-E6 com RMSD de 0,53 ±0,15 Å para o peptídeo cíclico IV. No caso do cíclico a ponte dissulfeto entre C1-C5 está mostrada em apenas uma das estruturas (em amarelo).





Figura 54:Estruturas tridimensionais do peptídeo IV derivadas dos dados obtidos por 2D-¹H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/CD₃OH (1:1, v/v) a 25°C. A superposição dos átomos do esqueleto perptídico foi feita nos seguintes domínios: C5-F10 com RMSD 0,33±0,12 Å (A); K2-F10 com RMSD 0,77±0,25 Å (B). Em B, a fita foi desenhada para melhor representar a conformação do esqueleto peptídico. A ponte dissulfeto entre C1-C5 está mostrada em apenas uma das estruturas (em amarelo).



Figura 55: Espectros de CD dos peptídeos III (A) e IV (B) em função da variação da porcentagem de TFE. Condições experiementais: 0,01M de peptídeo em solução de tampão fosfato 5mM, pH 6,0 a 20°C. Em termos de flexibilidade total, entretanto, este peptídeo se mostrou mais flexível em tampão/TFE do que em tampão/MeOH (**Figura 54.B**). De fato, dentre as estruturas tridimensionais do peptídeo IV em TFE/tampão fosfato obtidas a paritr dos dados RMN, não foi detectado nenhum grupo de estruturas cujas cadeias peptídicas fossem superponíveis em uma extensão maior do que quatro ou cinco resíduos de aminoácidos (**Figura 56.B**), indicando que o peptídeo é mais flexível neste solvente do que em MeOH/tampão fosfato. Os resultados obtidos em TFE/tampão fosfato demonstram que o peptídeo IV não possui uma tendência real em assumir conformações helicoidais estáveis.

É interessante notar que as dobras locais observadas para o peptídeo **IV** tanto na presença de MeOH quanto de TFE se mostraram razoavelmente superponíveis àquela do fragmento correspondente na estrutura cristalina do FGF-1 (Blaber et al., 1996, Ogura et al., 1999) (**Figura 57.A**, **B** e **C**).

O comportamento conformacional dos peptídeos foi ainda analisado em presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS). Em baixas concentrações de SDS, ambos exibiram conformações estendidas desordenadas. Em concentrações crescentes de SDS, entretanto, foram observadas diferenças conformacionais interessantes: somente o peptídeo cíclico sofreu transições conformacionais complexas que incluem o dobramento em uma estrutura intermediária do tipo β (**Figura 58**).

Os resultados descritos e discutidos acima mostraram que, em soluções aquosas, o peptídeo mitogênico **IV** poderia ser encontrado em um equilíbrio dinâmico rápido de estados não ordenados (*unfolded*). Em condições experimentais apropriadas este poderia ser induzido a adquirir estruturas locais ordenadas diretamente relacionadas com a sua conformação ativa. Os efeitos da adição de co-solventes, *in vitro*, poderiam estar refletindo aquilo que ocorre durante a interação deste peptídeo com os receptores dos FGFs (FGFR) *in vivo*. Esta hipótese se suporta na grande semelhança observada entre as estruturas secundárias de determinados domínios do peptídeo isolado com àquela adotada pelo fragmento correpondente na estrutura cristalina da molécula de FGF-1 (**Figura 57**). Além disso, tendo em vista que o SDS possui propriedades que podem mimetizar a superfície polar do receptor (Ruzza et al., 1995), a complexa transição conformacional observada do peptídeo em sua presença revelou uma capacidade intrínseca de **IV** em adotar uma estrutura do tipo β (**Figura 58**).



Figura 56: Estruturas tridimensionais do peptídeo IV derivadas dos dados obtidos por 2D-¹H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/TFE-d₃ (1:1 v/v) a 25°C. A superposição dos átomos do esqueleto perptídico foi feita nos seguintes domínios: K2-E6 com RMSD 0,91±0,29 Å (A); E6-F10 com RMSD 0,50±0,21Å (B). Em B, a fita foi desenhada para melhor representar a conformação do esqueleto peptídico. A ponte dissulfeto entre C1-C5 está mostrada em apenas uma das estruturas (em amarelo).



Figura 57: Superposição de uma estrutura tridimensional representativa do peptídeo V (em vermelho) derivada dos dados obtidos por 2D-¹H-RMN em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0/CD₃OH (1:1, v/v) a 25°C com o fragmento correspondente da estrutura do cristal do FGF-1 (em azul). A superposição dos átomos do esqueleto perptídico foi feita nos seguintes trechos: C1-H4 com RMSD 0,65 Å (A); H4-E6 com RMSD 0,09Å (B); C1-N8 com RMSD 2,2 Å. Na mistura tampão fosfato/TFE-d₃, foram obtidos resultados de RMSD semelhantes para os mesmos trechos 0,51 Å (A) e 0,11 Å (B), não tendo sido possível superpor as estruturas do peptídeo com a seqüência do FGF-1 correpondente por uma extensão maior do que esses mostrados.



Figura 58: Espectros de CD de III (A) e IV (B) em função da variação da porcentagem de SDS. Condições experimentais: 0,01M de peptídeo em solução de tampão fosfato 5 mM, pH 6,0 a 20°C.

4.5.2. Peptídeo Ac-NTTDKENEVLH-NH₂ (XVIII) derivado do FGFR-1**b** (domínio DIII-*loop* DE)

Como descrito no ítem 4.4.1.b, o peptídeo **XVIII** que possui a seqüência derivada da alça DE do domínio III do FGFR-1β exibiu uma atividade inibitória das atividades mitogênicas dos FGF-1 e FGF-2, tendo sido ela mais específica para o FGF-2.

Esta atividade mostrou ser seqüência-dependente, já que outro peptídeo derivado da alça FG (*Ac-SLAGNSIGLSH-NH*₂, **XIX**) do mesmo domínio foi completamente inativo, não tendo nenhum efeito sobre as atividades mitogênicas de ambos os FGFs testados.

Embora a afinidade do peptídeo **XVIII** pelos dois FGFs fosse bastante baixa, os resultados obtidos sugeriram que a alça DE contenha resíduos de aminoácidos essenciais para a ligação da molécula de FGF-2 ao FGFR-1. Essa alça havia sido sugerida através de estudos de mutagênese sítio-dirigida como constituindo uma provavel região que conferia especificidade ao receptor para a ligação dos diferentes FGFs (Wang et al., 1995, Gray et al., 1995). De fato, no modelo de interação entre o FGF-2 e o seu receptor recentemente proposto, a posiçao da alça DE do FGFR-1 coincide com a região de contato entre este receptor e o sitio 2 da proteína (Venkataraman et al., 1999). Estes dados corroboram os resultados por nós obtidos com o peptídeo **XVIII**.

Com vistas a especular sobre tal interação e devido ao nosso interesse em desenhar novos peptídeos desta região com atividade inibitória dos FGFs superior, demos início à investigação do comportamento conformacional do peptídeo ativo. Assim, o peptídeo foi analisado também no laboratório do Dr. Alberto Spisni da Universidade de Parma, Itália, quanto à sua capacidade em adotar algum tipo de estrutura secundária estável em solução.

Os espectros de CD obtidos pela titulação da solução tamponada do peptídeo **XVIII** com TFE está mostrado na **Figura 59**. É possivel observar que em baixas proporções deste solvente orgânico, o peptídeo não adota qualquer estrutura ordenada estável. Em concentrações mais altas, por outro lado, verificou-se a presença de um ponto isodicróico em 203 nm, o que indica uma transição clara para conformações α -helicoidais bem definidas.

As estruturas derivadas dos dados obtidos por ¹H-RMN deste peptídeo em TFE corroboram os resultados de CD mostrados acima, atestando a tendência exibida pelo peptídeo **XVIII** em adotar uma conformação helicoidal (**Figura 60**).



Figura 59: Espectros de CD do peptídeo XVIII em função da adição de quantidades crescentes de TFE (%, v/v) . Condições experimentais: 0,01M em solução tampão fosfato 5mM, pH 6,0 a 20°C.



Figura 60: Estruturas tridimensionais selecionadas do peptídeo XVIII derivadas dos dados obtidos por ¹H-RMN e após uma superposição dos átomos do esqueleto peptídico do trecho Asp4-Leu10. Condições experimentais: TFE/d₃/tampão fosfato pH 6,0 (70:30, v/v) a 25°C.

5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O uso de peptídeos sintéticos biologicamente ativos e o desenho racional de outros deles derivados aliados aos estudos estruturais destes compostos, em solução ou na forma cristalina, tem trazido importantes contribuições para o entendimento dos mecanismos de interação ligante-receptor, para a elucidação das conformações ativas e para o desenvolvimento de novos agonistas, antagonistas e inibidores das atividades biológicas de importantes hormônios peptídicos e proteínas.

Como já citado, muitos outros autores descreveram alguns peptídeos sintéticos biologicamente ativos relacionados aos FGFs (item 1.4. da seção de Introdução). Apesar de se tratarem de peptídeos curtos e lineares, e provavelmente muito flexíveis, esses compostos tem sido muito úteis para a identificação dos sítios ativos nos domínios funcionais da proteína nativa.

Em contraste, peptídeos sintéticos de conformação restrita relacionados aos FGFs nunca foram descritos anteriormente. Os resultados obtidos no presente trabalho e os dados descritos na literatura demonstram que estes tipos de compostos podem fornecer informações mais precisas sobre os requisitos estruturais necessários para a expressão das atividades biológicas da proteína do que os peptídeos lineares.

No FGF-2, a região onde se localiza o Sítio 2 foi sugerida como uma parte da molécula que contem resíduos importantes para a expressão da atividade mitogênica (Springer et al., 1994). No hFGF-1, essa região se constituirira de resíduos de aminoácidos do fragmento ¹⁰¹KHAEKNWF¹³² e foi sugerida como sendo um sítio que confere à proteína especificidades de ligação aos diferentes FGFRs presentes na superfície celular (Springer et al., 1994; Seddon et al., 1995; Blaber et al., 1996).

Como mostrados acima, os peptídeos Ac-HAEKNWF-NH₂ (II), Ac-SKKHAEKNWF-NH₂ (III), c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] (IV), c(1-5)[Ac-CKKHCEKWF-NH₂] (V) e Ac-SKKHA-NH₂ (V); c(1-5)[Ac-CKKHC-NH₂] (VII) que correspondem a fragmentos do sítio 2 do hFGF-1, foram propostos com a finalidade de verificar a hipótese de que não somente a presença, mas a orientação adequada das cadeias laterais dos aminoácidos W¹⁰⁷ e F¹⁰⁸ era requerida para a expressão da atividade mitogênica de peptídeos derivados deste Sítio 2 da proteína (Oyama et al., 1996). Quando testados em culturas de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3, os peptídeos II, III, VI e IV mostraram-se essencialmente inativos. Já o peptídeo cíclico IV, que contem uma ligação dissulfeto intramolecular nas posições 1 e 5, foi mitogênico e capaz de inibir a atividade mitogênica do hFGF-1 em culturas de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3 (ED₅₀ ~50 μ M, ID₅₀ ~60 μ M). Este teve a atividade mitogênica diminuída quando a N⁸ foi subtraída de sua seqüência como mostrado pelo seu análogo cíclico V. Embora as atividades mitogênicas tivessem sido 10⁴ menor que a da proteína nativa, esses resultados demonstram que de fato existe uma correlação entre a capacidade de agonistas peptídicos do hFGF-1 em adotar conformações preferenciais e exibir uma atividade mitogênica.

Devido à similaridade em suas seqüências primárias e diferenças nas atividades mitogênicas exibidas por III e IV, estes peptídeos foram analisados por técnicas de CD e ¹H-NMR com o objetivo de determinar suas conformações em solução (Kiyota et al., 1999). A comparação entre os resultados obtidos por simulações de Dinâmica Molecular sugeriram que o peptídeo IV poderia adotar conformações preferenciais melhor definidas do que III. Além disso, suas conformações eram semelhantes àquela assumida pelo fragmento correspondente na proteina nativa. Os dados obtidos por CD indicaram que, mesmo estando na forma estendida em meio aquoso, estes peptídeos poderiam adotar conformações de estrutura secundária em condições experimentais apropriadas. Como descrito acima, as diferenças nos comportamentos conformacionais de **III** e **IV** foram observadas na presença de SDS, que possui propriedades que podem mimetizar a superfície polar do receptor (Ruzza et al., 1995). Na presença deste, o peptídeo **IV** revelou uma capacidade intrínseca em adotar uma estrutura do tipo β .

Predições estruturais sugeriram a presença de uma dobra como tendo uma possível relevância para a atividade biológica deste segmento do FGF (Blaber et al., 1996, 1997; Pineda-Lucena et al., 1996). As dobras em geral (β - ou γ - *turns*) são sugeridas funcionarem como sítios de nucleação em processos de enovelamento de proteínas e de reconhecimento em complexos imunológicos, metabólicos e mecanismos regulatórios endocrinológicos (Xie et al., 1995). As dobras β especificamente envolvem quatro resíduos de aminoácidos e podem ter uma geometria bastante variada (tipos I, II, III, I', II' e III') em comparação com as outras conformações α -hélices ou folhas β encontradas em fragmentos peptídicos (Xie et al., 1995). Assim, investigamos as conformações dos peptídeos III e IV em 50% MeOH que é um solvente orgânico conhecido como estabilizador de dobras (Zhong & Johnson, 1992; Segawa et al., 1990). As estruturas de III derivadas de RMN revelaram a presença de uma dobra entre os resíduos S¹ - A⁵ e uma porção C-terminal bastante flexível. Por outro lado, as estruturas de IV se caracterizaram pela presença de uma dobra no trecho C¹ - C⁵, de um motivo helicoidal no trecho E⁶- W⁹ e de um γ turn no trecho H⁴ - E⁶. Além disso, foi possível se obter uma boa superposição do γ -turn deste trecho do peptídeo com o fragmento correspondente na estrutura cristalina do hFGF-1 (Blaber et al., 1996; Ogura et al., 1999). Os resultados indicaram que a restrição conformacional presente no peptídeo IV induziu uma conformação mais definida em sua porção N-terminal e uma maior mobilidade da outra porção Cterminal favorecendo o posicionamento adequado das cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos W^e e F¹⁰ e também o resíduo N^e, sugeridos anteriormente como sendo essenciais para a atividade mitogênica do FGF-1 (Kiyota et al., 1999).

Os FGFs são proteínas ligantes de heparina (Kan et al., 1993; 1996; McKeehan et al., 1999; Venkataraman et al., 1999). Como se sabe, a atividade mitogênica do hFGF-1 é potenciada pela HEP exógena. É descrito também que a HEP parece se ligar ao hFGF-1 por interação iônica com alguns resíduos de aminoácidos básicos contidos na região do sítio 2 da proteína (Digabriele et al., 1998). O resíduo K¹¹⁸ junto com um ou dois dentre os resíduos K¹¹², K¹¹³, R¹²² e K¹²⁸ dessa região da proteína foram sugeridos como sendo essenciais para a ligação de HEP e formação de um dímero biologicamente ativo do hFGF-1 (Thompson et al. 1994; DiGabrielle et al., 1998). O peptídeo I foi capaz de se ligar à HEP-Sepharose (Oyama et al., 1996), mas ao contrário do hFGF-1, não teve sua atividade mitogênica potenciada por HEP quando esta foi adicionada simultanente à cultura de fibroblastos Balb/c 3T3. Como mostrado acima, a HEP teve um efeito diferente sobre a atividade mitogênica do análogo de I, o peptídeo Ac-WFVGLKNGSSKRGPRT-NH₂ (**X**), que não apresenta uma das lisinas da sequência [...LKKN..] presente em I. Isto indicou que apenas uma delas era suficiente para a atividade

mitogênica de I e sugeriu a possibilidade do envolvimento de um desses resíduos para ciclizações. A comprovação da alta flexibilidade de I em solução e os resultados obtidos com este análogo X nos levou a averiguar sobre requisitos estruturais determinantes da atividade mitogênica exibida pelo peptídeo I e buscar análogos mais ativos ou ainda com efeito antagônico ou inibitório do hFGF-1. Diversas seqüências peptídicas estruturalmente modificadas derivadas de I foram desenhadas com a finalidade de avaliar a contribuição dos resíduos sugeridos com sendo essenciais para a atividade mitogênica da proteína e os efeitos de uma restrição conformacional sobre a atividade mitogênica de I. Os análogos cíclicos c(4-7) [Ac-WFVCLPCKR-NH₂] (XII) e c(3-13) [Ac-WFCGLPSKRGPRC-NH₂] (XV) que apresentam substituição do segmento ¹¹²KKNGS¹¹⁶ por uma prolina e deleção de ¹²⁰GPRT¹²³ (XII) ou apenas de ¹²⁰GPRT¹²³ (**XV**), exibiram atividades comparáveis a do I. Ao contrário, os análogos lineares Ac-WFVGLPSKR-NH₂ (XI) e Ac-WFVGLPSKRGPRT-NH₂ (XIV) e o cíclico c(3-7)[Ac-WFCGLPCKR-NH₂] (XIII) correspondentes foram inativos. Os resultados obtidos com estes peptídeos foram indicativos de que apenas uma das lisinas (¹¹²K ou ¹¹³K) era essencial para a atividade mitogênica do peptídeo I. A manutenção do posicionamento da cadeia lateral de um destes resíduos em relação a de outros resíduos contidos na següência parece ser importante a, pois a substituição do segmento ¹¹²KKNGS¹¹⁶ por uma prolina e/ou deleção de ¹²⁰GPRT¹²³ (peptídeos XI e XIV) podem abolir a atividade mitogênica do peptídeo mitogênico. Uma restrição conformacional que mantem a distância e as orientações relativas entre os resíduos WF e KR (considerados essenciais para a atividade) na seqüência parece ser suficiente para a expressão da atividade mitogênica.

Os dados experimentais obtidos com os peptídeos acima serviram de base para o desenho de novos análogos de c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH₂] (**IV**), os peptídeos c(5-14)[Ac-SKKHEEKNWFVGLKK-NH₂] (**VIII**) e c(1-5)[Ac-DKKHDbuEKNWF-NH₂] (**IX**). Estes poderiam fornecer informações adicionais valiosas sobre os determinantes estruturais da atividade mitogênica de peptídeos derivados dessa região da proteína e poderiam auxiliar na busca de agonistas mais potentes ou estáveis da mesma. Apesar de a ligação lactama presente em **IX** ser quimicamente mais estável do que a ponte dissulfeto presente em **IV** (mitogênico), o peptídeo **IX** foi inativo quando testado em cultura de fibroblastos Balb/c 3T3. Isto sugeriu que a distância da ligação covalente formada em **IV** foi mais apropriada para induzir uma conformação mais parecida com a do fragmento na proteína nativa. Também foram assim desenhados os novos análogos do peptídeo **I**, Ac-WFVGLKANGSSKRGPRT-NH₂ (**XVI**) e Ac-WFVGLAKNGSSKRGPRT-NH₂ (**XVI**) que apresentam substituições de uma das lisinas 112 ou 113 por uma alanina. Estes exibiram atividades mitogênicas comparáveis à de **I** e maiores do que a de **X**.

Como descrito anteriormente, o FGF-1 pode se ligar a todas as isoformas de FGFR (Ornitz et al., 1996; Blaber et al., 1996). Os peptídeos mitogênicos foram capazes de competir com hFGF-1 marcado pela ligação aos FGFR-1 presentes nos fibroblastos de camundongo Balb/c 3T3, entretanto, não temos uma evidência experimental direta para sugerir que os mesmos expressam sua mitogenicidade através de uma ligação específica aos domínios extracelulares dos FGFRs. Outros receptores estão também presentes nas superfícies celulares

como, por exemplo, o HS que liga os FGFs e parece ter um papel importante na formação de complexos FGF:FGFR:HS biologicamente ativos (Pantoliano et al., 1994; Faham et al. 1996; DiGabrielle et al., 1998; Venkataraman et al., 1999).

Paralelamente a estes estudos, foi desenvolvido um modelo teórico dos domínios extracelulares DII e DIII do FGFR-1β. A partir do posicionamento gráfico das moléculas de hFGF-1 e de um hexassacarídeo de heparina junto a este modelo, foram desenhados os peptídeos *Ac*-¹⁷⁰NTTDKENEVLH¹⁸⁰-*NH*₂ (**XVIII**) e *Ac*-¹⁹⁴SLAGNSIGLSH²⁰⁴-NH₂ (**XIX**) (Oyama et al., 1997). Como mostrado na seção anterior, a atividade inibitória específica para o FGF-2 exibida pelo peptídeo **XVIII** parece ser um indicativo de que a alça DE do domínio DIII do receptor pode estar envolvido na ligação a esta proteína. Os resultados obtidos pela análise conformacional do peptídeo **XVIII** por CD e ¹H-RMN indicaram que este peptídeo exibe uma forte tendência em assumir uma estrutura helicoidal em solução aquosa contendo 50% MeOH deuterado. Os resultados obtidos com este peptídeo foram concordantes com os obtidos por Gray e colaboradores (1995) e corroboram o modelo do complexo FGF-2/FGFR-1 proposto por Venkataraman e colaboradores (1999).

O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que: 1) a presença de W¹⁰⁷ e F¹⁰⁸ é, de fato, essencial para a expressão da atividade mitogênica de peptídeos derivados do sítio 2 do hFGF-1; 2) a presença de N¹⁰⁶ adjacente ao *core* hidrofóbico constituído pelos resíduos W¹⁰⁷F¹⁰⁸ é importante; 3) a ciclização do peptídeo IV foi decisiva para a expressão de sua atividade, indicando que, não apenas a presença, mas o posicionamento adequado das cadeias laterais de N¹⁰⁶, W¹⁰⁷ e F¹⁰⁸ são determinantes; 4) apenas uma das lisinas (K¹¹² ou K¹¹³) é essencial para a atividade mitogênica (**X**, **XVI** e **XVII**); 5) o importante parece ser a manutenção do posicionamento das cadeias laterais em relação aos dos outros resíduos contidos na seqüência, uma vez que, a substituição do segmento ¹¹²KKNGS¹¹⁶ por uma prolina e/ou deleção de ¹²⁰GPRT¹²³ (peptídeos **XI** e **XIV**) abolem a atividade mitogênica do peptídeo; 6) uma ciclização que mantem a distância e as orientações relativas entre WF e KR (considerados essenciais para a atividade) na seqüência (**XII** e **XV**) leva à recuperação da atividade; 7) a atividade inibitória específica para o FGF-2 exibida pelo peptídeo **XVIII** parece ser um indicativo de que a alça DE do domínio DIII do receptor pode estar envolvido na ligação a esta proteína.

Estas conclusões são relevantes e essenciais para: 1) o entendimento dos requisitos estruturais necessários para a expressão da atividade mitogênica dos peptídeos estudados e, como reflexo, do hFGF-1; 2) o desenho de novos agonistas, antagonistas ou inibidores do sistema FGF.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-OBEIDI, F., O'Connor, S.D., Job, C., Hruby, V.J. & Pettitt, B.M. (1998) NMR and quenched molecular dynamics studies of super-potent linear and cyclic α-melanotropins. J. Peptide Res. 51: 420-431.
- Al-OBEIDI, F., Wu, J.J. & Lam, K.S. (1998) Protein tyrosine kinases: structure, substrate specificity and drug discovery. **Biopolimers 47** (3): 197-224.
- ALSINA, J., Rabanal, F., Giralti, E. & Alberício, F. (1994) Solid-Phase synthesis of head to tail cyclic peptides via lysine side chain anchoring. **Tetrahedron Lett. 35** (151): 9633-9636.
- ARMELIN, H.A. (1973) Pituitary Extracts and Steroid Hormones in the Control of 3T3 Cell Growth. **Proc. Natl. Acad. Sci USA 70**: 2702-2706.
- ARMELIN, H.A.; Lotfi, C.F.P. & Lepique, A.P. (1996) Regulation of growth ACTH in the Y-line of mouse adrenocortical cells. **Endocrine Res. 22** (4): 373-383.
- BAILIE, J.R., Walker, B., Nelson, J. & Murphy, R.F. (1994) Synthesis of a cyclic analogue of the C-loop region of EGF, containing 1-aminocyclopropane 1-carboxilic acid. Int. J. Pep. Protein Res. 43 (3): 225-229.
- BAIRD, A. & KLAGSBRUN, M. (1991) The fibroblast growth factor family. **Cancer Cells 3**: 239-43.
- BAIRD, A.; Schubert, D.; Ling, N. & Guillemin, R. (1988) Receptor- and heparin- binding domains of basic fibroblast growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85**:2324-2328.
- BASBAR, E., Gross, C.M., Woodward, C. & Barany, G. In: Fields, G.B. (Ed.). Meth. Enzymol. 289, Academic Press, New York, 1997, pp. 587-611.
- BATEMAN, A. & CHOTHIA, C. (1995) Outline structures for extracellular domains of the fibroblast growth factor receptors. **Nat. Struct. Biol. 2** (12): 1068-1074.

BAYER, E. (1991) Towards the chemical synthesis of protein. Angew. Chim. 30 (2): 113-216.

BITTOÜN, P., Bagheri-Yarnmand, R., Chaubert, F., Crépin, Jezefonwicz, J. & Fermandjian, S. (1999) Effects of the binding of a dextran derivative on fibroblast growth factor 2: secondary structure and receptor-binding studies. **Biochem. Pharmacol. 57**: 1399-1406.

- BLABER, M., Adamek, D.H., Popvic, A. & Blaber, S.I. Biophysical and structural analysis of human acidic fibroblast growth factor. *Techniques in Protein Chemistry VIII*, Academic Press, pp. 745-753, 1997.
- BLABER, M., DiSalvo, J. & Thomas, K.A. (1996) X-ray crystal structure of human acidic fibroblast growth factor. **Biochemistry 35**: 2086-2094.
- BLUNDELL, T. L. (1996) Structure-based drug design. Nature 384: 23-26
- BODANSKY, M. *Peptide Chemistry: a practical texbook*. 2nd rev. ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1993.
- BOSSHARD, H.R., In Gutte, B. (Ed.) *Peptides: Synthesis, Structure, and Applications,* Academic Press, New York, 1995, pp. 419-454.
- BOTTARO, D.P., Fortney, E., Rubin, J.S. & Aaronson, S.A. (1993) A keratinocyte growth factor receptor-derived peptide antagonist identifies part of the ligand binding site. J. Biol. Chem. 268 (13): 9180-9183.
- BROOKS III, C.L. (1995) Methodological advances in molecular dynamics simulations of biological systems. Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 211-215.
- BROOKS III, C.L., Karplus, M. & Pettitt, B.M. *Proteins A theoretical perfect of dynamics structure (Advances in chemical physics)*, vol LXXI, Ed. John Wiley, New York, 1988.
- BURGESS, W.H.; Shaheen, A.M.; Hampton, B.; Donohue, P.J. & Winckles, J.A. (1991) Structure-function studies of heparin binding (acidic fibroblast growth factor-1 using sitedirected mutagenesis). J. Cell. Biochem. 45: 131-138.
- BURKE Jr, T.R. & ZANGH, Z.Y. (1998) Protein tyrosine phosphatases: structure, mechanism and drug discovery. **Biopolymers 47** (3): 243-260.
- CAVELIER-FRONTIN, F., Achmad, S., Verducci, J. & Jacquier, J. (1993) J. Mol. Struct. 286:125-130.
- CHAMBERLIN, S.G., Sargood, K.J., Richter, A., Mellor, J. M., Anderson, D.W.Richards, N.G.J., Turner, D.L., Sharma, R.P., Alexander, P. & Davies, D.E. (1995) A constrained peptide analogues of transforming growth factor-α residues cysteine 21-32 are mitogenically active. J. Biol. Chem. 270 (36): 21062-21067.

- CHOREV, M., Roubini, E., Mckee, R.L., Gibbons, S.W., Goldman, M.E., Caulfield, M.P. & Rosenblatt, M. (1991) Cyclic parathyroid hormone related protein antagonists: lysine 13 to aspartic acid 17 (i to i+4) side chain to side chain lactamization. **Biochemistry 30** (24): 5968-74.
- CREIGTHON, T.E. *Proteins: Structure and Molecular Principles.* Freeman & Co., 2nd ed., 1992.
- CUSHMAN, D.W. & CHEUNG, H.S. (1971) Biochem. Pharm. 20: 1637.
- DICKES, D.F., Nestor, J.J., Jr., Ferger, M.F. & du Vigneaud, V. (1974) [1-β-mercapto-β,βdiethylproprionic acid]-8-lysine-vasopressin, a potent inhibitor of 8-lysine vasopressin and oxytocin. J. Med. Chem. 17: 250-252.
- DIGABRIELE, A.D., Lax, I., Chen, D.I., Svahn, C.M., Jaye, M., Schlessinger, J. & Hendrickson, W.A. (1998) Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor.Nature 393: 812-817.
- DYSON, H.J. & WRIGTH, P.E. (1995) Antigenic peptides. FASEB J. 9: 37-42
- DYSON, H.J., Merutka, G., Waltho, J.P., Lerner, R.A. & Wright, P.E. (1992). Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. I. Myohemoerythrin. J. Mol. Biol. 226: 795-817.
- ELLIS, R.J. (1994) Roles of molecular chaperones in the protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. 4: 117-122.
- ELLMAN, G.L. (1959) Tissue sulphydrylgroups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 72-77
- EVANS, J.S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press Inc., New York, USA, 1995, pp.1-234.
- FAHAM, S.; Hileman, R.E.; Fromm, J.R.; Linhardt, R.J. & Rees, D.C. (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. **Science 271**: 1116-1120.
- FANNON, M. & NUGENT, M.A. (1996) Basic fibroblast growth factor binds its receptors, is internalized, and stimulates dna synthesis in balb/c 3t3 cells in the absence of heparan sulfate. J. Biol. Chem. 271: 17949-17956.

FAUCHÈRE, J.L. & THURIEAU, C. (1992) Adv. Drug Res. 23: 127-159

- FELIX, A.M.; Heimer, E.P.; Wang, C.T.; Lambros, T.J.; Fournier, A.; Mowles, T.F.; Maines, S.; Campbell, R.M.; Wegrzynski, B.B.; Toome, V.; Fry, D. & Madison, V.S. (1988) Synthesis, biological activity and conformational analysis of cyclic GRF analogs. Int. J. Peptide Protein Res. 32:441-454.
- FIELDS, G.B. & NOBLE, R.L. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. Int. J. Peptide Protein Res. 35: 161-214.
- FLAUMENHAFT, R., Moscatelli, D. & Rifkin, D.B. (1990) Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. J. Cell. Biol. 111: 1651-59.
- FROMM, J.R., Hileman, H.E., Caldwell, E.E.O., Weiler, J.M. & Linhardt, R.J. (1995) Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin do acidic fibroblast growth factor. Arch. Biochem Biophys. 323 (2): 279-287.
- FROMM, J.R., Hileman, H.E., Weiler, J.M. & Linhardt, R.J. (1997) Interaction of fibroblast growth factor-1 and related peptides with heparan sulfate and its oligosaccharides. Arch. Biochem Biophys. 346 (2): 252-262.
- FUTAKI, S. (1998) Peptide ion channels: Design and creation of function. **Biopolymers 47** (1): 75-82.
- GAUTHIER, T.J., Liu, B., Morales, G.A. & McLaughlin, M.L. In: Tam, J.P. & Kaumaya, P.T.P. (Eds.) *Peptides: Frontiers of Peptide Science*, Kluwer/ESCOM, The Netherlands, 1999, pp. 325-326.
- GHIARA, J.B.; Ferguson, D.C.; Satterthwait Dyson, J.H. & Wilson, I.A. (1997) Structure-based design of a constrained peptide mimic of HIV-1 V 3 loop neutralization site. J. Mol. Biol. 266: 31-39.
- GOLDFARB, M. (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J. Biol. Chem. **271** (26), 15292-15297.
- GOSPODAROWICZ, D. & CHENG, J. (1986) Heparin protects basic and acidic fibroblast growth factors from inactivation. J. Cell. Physiol. 128: 475-484.
- GRAY, T.E.; Eisenstein, M.; Shimon, T.; Givol, D. and Yayon, A. (1995) Molecular Modeling Based Mutagenesis defines Ligand Binding and Specificity Determining Regions of fibroblast Growth Factor Receptors. **Biochemistry 34**: 10325-10333

- GRIESINGER, C., Otting, G., Wütrich, K. & Ernst, R.R. (1988) Clean TOCSY for ¹H spin system identification in macromolecules. **J. Am. Chem. Soc. 110**: 7870-7872.
- GROSS, J.L., Herblin, W.F., Dusak, B.A., Czerniak, P., Diamond, M.D., Sun, T.Eidsvoog, K., Dexter, D.L., Yayon, A. (1993) Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth in vivo. J. Natl. Cancer Inst. 85: 121-131.
- GURRATH, M., Müller, G., Kessler, H., Aumailley, M. & Timpl, R. (1992) Conformation/Activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. **Eur. J. Biochem. 210** (3): 911-921.
- GUTTE, B. & KLAUSER, S. In: Gutte, B. (Ed.) *Peptides: Synthesis, Structure, and Applications*, Academic Press, New York 1995, p. 363-394.
- HARPER, J.W. & LOBB, R.R. (1988) Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor. Effect on mitogenic activity and Heparin affinity. **Biochemistry 27**: 671-678.
- HELDIN, C-H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. **Cell 80**: 213-223.
- HOHR, M. & ROGERS, D. (1995). Receptor surface models. 2. Application to quantitative structure-activity relationship studies. J. Med. Chem. 38: 2091-2102.
- HOLLOSI, M., Majer, Z., Ronal, A.Z., Magyar, A., Medzihradsky, K., Holly, S., Fasman, G.D., (1994) CD and FT-IR spectroscopic studies of peptides. II. Detection of β-turns in linear peptides. **Biopolymers 34**: 177-185.
- HONIG, B. (1995) Theory and simulation. Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 203-204.
- HORWELL, D.C. (1995) The "peptoid" approach to the design of non-peptide, small molecule antagonists of neuropeptides. **TIBTECH 13**:132-134.
- HOWL, J., Langel, U., Hautin, S.R., Valkane, A., Yarwod, N.J., Saar, K. & Wheatley, M. (1997)
 Chimeric strategies for the rational design of bioactive analogs of small peptide hormones.
 FASEB J. 11: 582-590.
- HRUBY, V.J. (1989) Designing molecules: specific peptides for specific receptors. **Epilepsia 30** (Suppl.1): S42-S50.

- HSU, Y-R, Nybo, R., Sullivan, J.K., Costigan, V., Spahr, C.S., Wong, C., Jones, M., Pentzer, A.G., Crouse, J.A., Pacifici, R.E., Lu, H.S., Morris, C.F. & Philo, J.S. (1999) Heparin is essential for a single keratinocyte growth factor molecule to bind and form a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor. **Biochemistry 38** (8): 2523-2534.
- HUHTALA, M.T., Penkainen, O. & Johnson, M.S. (1999) A dimeric ternary complex of FGFR1, heparin and FGF-1 leads to an "eletrostatic sandwich" model for heparin binding. **Structure 7** (6): 699-709.
- IMAMURA, T. Friedman, S.A.; Gamble, S.; Tokita, Y.; Opalenk, S.R., Thompson, J.A. and Maciag, T. (1995). Identification of domain within fibroblast growth factor-1 responsible for heparin-dependence. Biochim. Biophys. Acta. 1266: 124-130.
- IMPERIALI, B. & OTTESEN, J.J. (1998) Design strategies for the construction of independently folded polipeptide motifs. **Biopolymers 47** (1): 23-30.
- ITO, A.S., Castrucci, A.M.L., Hruby, V.J., Hadley, M.E., Krajcarski, D.T. & Szabo, A.G. (1993) Structure-Activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. **Biochemistry 32**: 12264-12272.
- JACKSON, D.Y., Burnier, J.P. & Wells, J.A. (1995) Enzymatic cyclization of linear peptide esters using sbtligase. J. Am. Chem. Soc. 117: 819-820.
- JACQUIER, R. (1989) La synthèse peptidique em phase solide: progrès rècents et perspectives. **Bull. Soc. Chim. France 2**: 220 236.
- JANIN, J. & CHOTHIA, C. (1990) The structure of protein-protein recognition sites. J. Biol. Chem. 265 (27): 16027-16030.
- JAYE, M.; Howk, R.; Burgess, W.; Ricca, G.A., Chiu., I.M.;Ravera, M.W.; O'Brien, S.J.; Modi,
 W.E.; Maciag, T. & Drohan, W.N. (1986) Human endothelial cell frowth factor: cloning,
 nucleotide sequence, and chromosome localization. Science 251: 90-93.
- JAYE, M.; Schlessinger, J. & Dionne, C.A.(1992) Fibroblast Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases: Molecular analysis and signal transduction. **Biochim. Biophys. Acta. 1135**: 185-199.
- JEENER, J., Meier, B.H., Bachmann, P. & Ernst, R.R. (1982) Investigation of exchange process by two dimensional NMR spectroscopy. **J. Phys. Chem. 71**: 4546-4553.

- JOHNSON, W.C. (1985) Circular dichroism and its empirical application to biopolimers. **Methods Bichem. Anal. 31**: 61-163.
- JOHNSON, D.E. & WILLIAMS, L.T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. **Adv. Cancer Res. 60**: 1-41.
- JONES, S. & THORNTON, J.M. (1996). Principles of protein-protein interactions. **Proc. Natl.** Acad. Sci. USA93: 13-20.
- KAISER, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I. (1970) Color test for the detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal. Biochem. 34: 595-598.
- KALJUSTE, K. & UNDÉN, A. (1994). A new general solid-phase method for the syntheses of backbone cyclized peptides. Int. J. Peptide Protein Res. 43: 505-511.
- KAN, M., Wang, F., Kan, M., To, B., Gabriel, J.L. & McKeehan, W.L. (1996) Divalent cations and heparin/heparan sulfate cooperate to control assembly and activity of the fibroblast growth receptor complex. J. Biol. Chem. 27: 26143-26148.
- KAN, M.; Wang, F.; Xu, J.; Crabb, J. W.; Hou, J. & Mckeehan, W. L. (1993) An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. Science 259: 1918-1921.
- KAN, M.; Shi, E.G. & MCKEEHAN, W.L. (1991) Identification and assay of fibroblast growth factor receptors. **Meth. Enzymol. 198**: 159-171.
- KANIA, R.S., Zuckermann, R.N. & Marlowe, C.K. (1994) Free C-terminal resin-bound peptides: Reversal of peptide orientation via a cyclization/cleavage protocol. J. Am. Chem. Soc. 116: 8835-8836.
- KARPLUS, M. Molecular Dynamics: Applications to proteins. In: Brooks III, C.L., Karplus, M. & Pettitt, B.M. Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics.
 Adv. Chem. Phys. LXXI, p.269, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- KATAOKA ,T., Beusen, D.D., Clark, J.D., Yodo, M. & Marshall, G.R. (1992) The utility of sidechain cyclization in determining the receptor-bound conformation of peptides: cyclic tripeptides and angiotensin II. **Biopolimers 32** (11): 1519-1533.
- KIRKPATRICK, S., Gellatt , C.D. Jr & Vecchi, M.P. (1983) Optimization by simulated annealing. **Science 220**: 671-680.

- KITAGAWA, O., Velde, D.V., Dutta, D., Morton, M., Takusagawa, F. & Aubé, J. (1995) Structural analysis of β-turn mimics containing a substituted 6-aminocaproic acid linker. J. Am. Chem. Soc. 117(19): 5169-5178.
- KIYOTA, S.; Oyama Jr., S.; Toma, I.N.; Viviani, W. Gambarini, A.G. & Miranda, M.T.M. Synthetic Peptides: Search for agonists and antagonists of human FGF-1. In: Livro de Resumos de Trabalhos apresentados na XXV^{a.} Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 1996, p.122 (M24).
- KIYOTA, S., Oyama Jr., S., Gambarini, A.G. & Miranda, M.T.M. Conformational studies of synthetic peptides derived from FGF-1. In: Livro de Resumos de Trabalhos apresentados na XXVII^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 1998, p. 182 (R-12).
- KIYOTA, S., Gambarini, A.G., Viviani, W., Oyama Jr, S., Toma, I.N., Sykes, B.D. & Miranda, M.T.M. New synthetic peptides derived from human fibroblast growth factor-1: Search for agonists and inhibitors. In: Tam, J.P. & Kaumaya, P.T.P. (Eds) *Peptides: Frontiers of Peptide Science*, ESCOM/Kluwer, The Netherlands, Proceedings of the 15th American Peptide Symposium, 1999, pp. 641-642.
- KIYOTA, S., Benedetti, A., Franzoni, L., Nicastro, G., Oyama Jr., S., Viviani, W., Gambarini, A.G., Spisni, A. & Miranda, M.T.M. In: *Peptides for the new millennium*, 16th American Peptide Symposium Program & Abstracts Volume, 1999, p. 266 (P379).
- KNORR, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. & Gillssen, D. (1989) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154.
- KUROKAWA, N. & OHFUNE, Y. (1993) Synthetic studies on antifungal cyclic peptides, echnocandins. Stereoselective total synthesis of echnocandins via a novel peptide coupling. **Tetrahedron 49** (28), pp. 695-6222, 1993.
- LEBL, M. & HRUBY, V. J. (1984) Synthesis of cyclic peptides by solid phase methodology. **Tetrahedon Lett. 25** (20): 2067-2068.
- LECOMTE, C., Sabatier, J.M., Van Rietschoten, J. & Rochat, H. (1998) Synthetic peptides as tool to investigate the structure and pharmacology of potassium channel-acting-chain scorpion. **Biochimie**: 151-154.
- LI, S.-C. & DEBER, C.M. (1998) Guidelines for membrane protein engineering derived from de novo designed model peptides. **Biopolymers 47**: 41-62.

- LI, S.-C. & DEBER, C.M. (1993) Peptide environment specifies conformation. J. Biol. Chem. 268: 22975-22978.
- LIDDLE, R.A, Green, G.M., Conrad, C.K., Willians, J.A. (1986) Proteins but not aminoacids, carbohidrats or fats stimulates CCK in the rats. **Am. J. Physiol. 251**: G243-G248.
- LIVINAH, O., Stura, E.A., Johnson, D.L., Middleton, S.A., Mulcahy, L.S., Wrighton, N.C., Dower, J.W., Jolliffe, L.K. & Wilson, I.A. (1996) Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: The EPO receptor complex at 2.8 Å. Science 273: 464-471.
- LORD, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. & Kosterlitz, H.W. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature (London) 267**: 495-499.
- MACARTHUR, M.W., Laskowski, R.A., Thornton, J.M. (1994) Knowledge-based validation of protein structure coordinates derived by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. Curr. Opin. Struct. Biol. 4: 731-737.
- MACIAG, T. (1995) Identification of domain within fibroblast growth factor-1 responsible for heparin-dependence. **Biochim. Biophys. Acta.** 1266,124-130.
- MACINNES, C. & SYKES, B.D. (1997) Growth factors receptors: Structure, mechanism, and drug discovery. **Biopolymers 43** (5): 339-366.
- MANT, C.T. & HODGES, R.S. *High-Performance Liquid Chromatography of peptides and proteins: separation, analysis and conformations*, CRC Press, 1991.
- MARION, D. & WÜTHRICH, K. (1983) Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ¹H ¹H spin-spin coupling constant in proteins. **Biochem. Biophysis. Res. Commun. 113**: 967-974.
- MARTZ, E. (1999) Nature of 3D Structural Data. **In:** The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (PDB) Experimental Methods (http://www.rcsb.org/pdb/experimental_methods.html).
- McCAMMON, J.A., Gelin, B.R. & Karplus, M. (1977) Dynamics of folded proteins. **Nature 267**: 585-589.
- McKEEHAN, W.L., Wu, X. & Kan, M. (1999) Requirement for anticoagulant heparan sulfate in the fibroblast growth factor receptor complex. J. Biol. Chem. 274: 21511-21514.

- McKEEHAN, W.L., Wang, F. & Kan, M. (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: Diversity of structure and function. **Prog. Nucleic Acid Mol. Biol. 59**: 135-173.
- MERRIFIELD, R. B. (1963) Solid Phase peptide synthesis. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154.
- MISICKA, A.& HURBY, V.J. (1994) Optimization of dissulfide bond formation. **Polish J. Chem. 68**: 893-899.
- MOORE, S. & STEIN, W.H. (1963) Chromatographic determination of amino acids by the use of automated recording equipment. **Meth. Enzymol. 6**: 809-813.
- MOSCATELLI, D. (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator productions by bovine capillary endothelial cells. J. Cell. Physiol. 131: 123-130.
- MOY, F.J., Seddon, A.P., Bohlen, P. & Powers, R. (1996) High-resolution solution structure of basic fibroblast growth factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry 35**: 13552-13561.
- MUIR, T.W., Dawsom, P.E., Fitzgerald, M.C. & Kent, S.B.H. In: Fields, G.B. (Ed.) Meth. Enzymol. 289, Academic Press, New York, 1997, pp. 545-564.
- MURZIN,A.G.; Lesk, A.M. & Chothia, C. (1992) β -Trefoil Fold Patterns of structures and sequence in the Kunitz inhibitors, interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. J. **Mol. Biol. 223**: 531-543.
- NESTOR, J.J., Ferger, M.F. & du Vigneaud, V. (1975) [1- β -mercapto- β , β -penta methylene propionic acid] oxytocin, a potent inhibitor of oxytocin. **J. Med. Chem. 18**: 284-287.
- NEUFELD, G. & GOSPODAROWICZ, D. (1986) Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. J. Biol. Chem. 261: 5631-5637.
- NIKIFOROVICH, G.V. & MARSHALL, G.R. (1993) Biochem. Bioph. Res. Commun., 195: 2222-2228.
- NUGENT, K.D. & DOLAN, J.D. (1991) Systematic approach to isolation, correction, and prevention of liquid chromatographic column problems. **J. Chrom. 544**: 3-12.
- OGURA, K., Nagata, K., Hatanaka, H., Habuchi, H., Kimata, K., Tate, S., Ravera, M.W., Jaye,
 M. Schlessinger, J. & Inagaki, F. (1999) Solution structure of human acidic fibrobalst growth factor and interaction with heparin-derived hexasaccharide. J. Biomol. NMR 13: 11-24.

- OLIVEIRA, B.M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard, D.R. & Cruz, C.J. (1990). Diversity of *conus* neuropeptides. Science 249: 257-263.
- ORNITZ, D.M.; Herr, A. B.; Nilsson, M.; Westman, J.; Svashn, C.M. & Waksman,G. (1995) Fibroblast growth factor binding and fibroblast growth factor receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. **Science 268**, 432-436.
- ORNITZ, D.M.; Xu, J.; Colvin, J.S.; McEwen, D.J.; MacArthur, C.A.; Coulier, F.; Gao, G. & Goldfarb, M. (1996) Receptor Specificity of fibroblast growth factor family. J. Biol. Chem. 271 (25): 15292-15297.
- OYAMA Jr., S., Miranda, M.T.M., Kiyota, S. & Gambarini, A.G. (1999) Molecular modeling as a powerful tool for the mapping of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 ligand binding determinants. **J. Mol. Model. 5**: 90-96.
- OYAMA Jr., S.; Miranda, M. T. M.; Toma, I. N.; Viviani, W. & Gambarini, A. (1996) Mitogenic activity of peptides related to the sequence of human Fibroblast Growth Factor-1.**Biochem. Mol. Biol. Int. 30**: 1237-1244.
- OYAMA Jr., S., Kiyota, S., Miranda, M.T.M., Gambarini, A.G. & Viviani, W. (1997) Threedimensional model structure for the extracellular domains of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR-1). J. Mol. Model. 3: 233-239.
- PALLIN, T.D. & TAM, J.P. (1995) Cyclisation of Totally Unprotected Peptides in Aqueous Solution by Oxime Formation J. Chem. Soc. Chem. Commun., 2021-2022.
- PAN, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, ^a, Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. & Prussiner, S.B. (1993) Conversion of α-helices into β-sheets features in the formation of scraopie prion proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90**: 10962-10966.
- PANTOLIANO, M.W.; Horlick, R.A.; Springer, B.A.; VanDyk, D.E.; Tobery,T.; Wetmore, D.R.; Lear, J.D.; Nahapetin, A.J.; Bradley, J.D. & Sisk, W.P. (1994) Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. **Biochemistry 33**: 10229-10248.
- PAVONE, C. & PEDONE, V. (1995) Design of metal ion binding peptides. **Biopolymers 37**: 401-410.

- PERKINS, J. & PETTITT, B.M. (1992) A dielectrically consistent interaction site theory for solvent-electrolyte mixtures. **Chem. Phys. Lett. 190**: 626-630.
- PESCE, A.J., Rosén, C-G. & Pasby, T.L. Fluorescence Spectroscopy: An introduction for Biology and Medicine, Marcel Dekker Inc., New York, NY,1971.
- PETTITT, B.M., Karplus, M. & Rossky, P.J. (1986). Integral equation model for aqueous solvation of polyatomic solutes: applications to the determination of the free energy surface for the internal motion of biomolecules. J. Phys. Chem. 90: 6335-6345.
- PINEDA-LUCENA, A., Jiménez, M.A., Lozano, R.M., Nielo, J.L., Santoro, J., Rico, M. & Giménez-Gallego, G. (1996). Three-dimensional structure of acidic fibroblast growth factor in solution: effects of binding to a heparin functional analog. J. Mol. Biol. 264: 162-178.
- POLESI, A., Formaggio, F., Crisma, M., Valle, G., Toniolo, C., Bonora, G. M., Broxterman & Kamphuis, Q. (1996) Peptides helices as rigid molecular rulers: A conformational study of isotactic homopeptides from α-methyl-α-isopropylglycine, [L-(αMe)Val]_n. Chem. Eur. J. 2 (9): 1104-1111.
- RANCE, M. (1987) Improved techniques for homonuclear rotating-frame and isotopic mixing experiments. J. Magn. Reson. 74: 557-564.
- RANCE, M., Sorensen, O.W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R.R. & Wütrich, K. (1983)
 Improved spectral resolution in COSY ¹H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117: 479-485.
- RAUSER, W. E. (1995) Phytochelatin and related peptides. Structure, bosynthesis, and function. **Plant Physiol. 109** (4): 1141-1149.
- RAY, J., Baird, A. & GAGE, F.H. (1997) A 10-amino acid sequence of fibroblast growth factor-2 is sufficient for its mitogenic activity on neural progenitor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7047-7052.
- REICH-SLOTKY, R.; Shaoul, E.; Berman, B.; Graziani, G. and Ron, D. (1995) Chimeric Molecules between Keratinocyte Growth factor and basic Fibroblast Growth Factor Define Domains that Confer receptor Binding Specificty. J. Biol. Chem. 270 (50): 29813-29818.
- RIVIER, J.E., Gaylean, R., Simon, L., Cruz, L., Oliveira, B.M. & Gray, W.R. (1987) Total synthesis and further characterization of the gamma-carboxyglutamate-containing "sleeper" peptide from *Conus geographus* venom. **Biochemistry 26**: 8508-8512.

- RIVIER, J.E.; Kaiser, R. & Galyean, R. (1978) Solid-phase synthesis of somatostatin and glucagon-selective analogs in gram quantities. **Biopolimers 17**: 1927-1938.
- RIZO, J., Sutton, R.B., Breslau, J., Koerber, S.C., Porter, J., Hagler, A.T., Rivier, J.E. & Gierasch, L.M. (1996) A novel conformation in a highly potent, constrained gonadotropinreleasing hormone antagonist. J. Am. Chem. Soc. 118: 970-976.
- ROASCH, D. & GEHRKE, C.W. (1970) The hydrolysis of proteins. J. Chromatogr. 52: 393-404.
- ROCHA E SILVA, M. (1963) The physiological significance of bradykinin. **Ann. N. Y. Acad. Sci. 104**: 190.
- ROSE, G.D., Gierasch, L.M. & Smith, J.A. (1985) Turns in peptides and proteins. Adv. Protein Chemistry 37: 1-109.
- RUZZA, P., Calderon, A., Fillippi, B., Biondi, B., Deana, A.D., Cesaro, L., Pinna, L.A. & Borin, G. (1995) Linear and cyclic synthetic peptides related to the main autophosphorylation site of the Src tyrosine kinases as substrates and inhibitors of Lyn. Int. J. Peptide Protein Res. 45: 529-564.
- SANDERSON, S.D., Kirnarsky, L., Sherman, S.A., Ember, S.A., Finch, A. & Taylor, S.M. (1994) Decapeptide agonists of human C5a: The relationship between conformation and spasmogenic and platelet aggregatory activities. J. Med. Chem. 37: 3171-3180.
- SARIN, V.K.; Kent, S.B.H.; Merrifield, R.B. (1980) J. Am. Chem. Soc. 103: 5463-5470.
- SATO, K., Hotta, M., Dong, M.H., Hu, HY., Taulene, J.P., Goodman, M., Nagai, U. & Ling, N. (1991) Solid phase synthesis of human growth-releasing factor analogs containing a bicyclic β- turn dipeptide. Int. J. Peptide Protein Res. 38: 340-345.
- SAWYER, T. K., Hruby, V.J., Darmen, P.S. & Hadley, M.E. (1982) [4-half-cystine, 10-half-cystine]α-melanocyte stimulating hormone: a cyclic α-melanotropin exhibiting superagonist biological activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79**: 1751-1755.

SCOPES, R. *Protein purification principles and practice*, Springer-Verlag, 3rd. Ed., 1994.

SEGAWA, S.I., Fukuno, T., Fujiwara, K. & Noda, Y. (1990) Local structures in unfolded lysozyme and correlation with secondary structures in the native conformation: helix-forming or –breaking propensity of peptide segments. **Biopolymers 31**: 397-509.

- SCHWYZER, R. (1995) 100 years Lock- and -Key Concept: Are Peptide Keys Shaped and Guide to their Receptors by Target Cell Membrane? **Biopolymers 37**: 5-16.
- SHING, Y.; Folkman, J.; Sullivan; R.; Butterfield, C.; Murray, J. & Klagsbrun, M. (1984) Heparinaffinity: Purification of a tumor derived capillary endothelial cell growth factor. Science 223: 1296-1298.
- SHIRAKI, K., Nishikawa, K. & Goto, Y. (1995) Trifluoroetanol-induced stabilization of the αhelical structure of β-lactoglobulin implication for non-hierarchical protein folding. J.Mol. Biol. 245: 180-194.
- SHORTLE, D. & SONDEK, J. (1995) The emerging role of insertions and deletions in protein engineering. **Curr. Opin. Biotechnol. 6**: 387-393.
- SIEBER, V. & MOE, G.R. (1996) Interactions contributing to the formation of a β-hairpin-like structure in a small peptide. **Biochemistry 35**: 181-188.
- SIUZDAK, G. Mass Spectrometry for Biotechnology, Academic Press, Inc., 1996
- SÖNNICHSEN, F.D., Van Eyk, J.E., Hodges, R.S. & Sykes, B.D. (1992) Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: na NMR and CD study using a synthetic actin peptide. **Biochemistry 31** (37): 8790-8798.
- SPATOLA, A.F.; Darlak, K.; and Romanovskis, P. (1996) An approach to cyclic peptide libraries: reducing epimerization in medium sized rings during solid phase synthesis. **Tetrahedron** Lett. 37 (5): 591-594.
- SPRINGER, B. A., Pantoliano, M.W., Barbera, F.A., Gunyulzu, P.L., Thompson, L.D., Herblin, W.F., Rosenfeld, S.A. & Book, G.W. (1994) Identification and concerted function of two receptor binding surfaces on basic fibroblast growth factor required for mitogenesis. J. Biol. Chem. 269 (43): 26879-26884.
- SREERAMA, N. & WOODY, R.W. (1993) A self-consistent method for analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Anal. Biochem. 209**: 32-44.
- STEER, D.L., Thompson, P.E., Blondelle, S.E., Houghten, R.A. & Aguilar, M.-I. (1998) Comparison of the binding of α -helical and β -sheet peptides to hydrophobic surface. J. **Peptide Res. 51**: 401-412.
- STEWART, J., M. & YOUNG, J.D. *Solid phase peptide synthesis*, Pierce Chemical Company 2nd. ed., Rockford, Illinois, USA, 1984.

- STORY, S.C. & ALDRICH, J. V. (1994) Side product formation during cyclization with HBTU on a solid support. Int. J. Peptide Protein Res. 43: 292-296.
- STRUTHERS, M.D., Cheng, R.P. & Imperiali, B. (1996) Design of a monomeric 23-residue polypeptide with defined tertiary structure. **Science 271**: 342-344.
- TAM, J.P. & SPETZLER, J.C. In: Fields, G.B. (Ed.) Meth. Enzymol. 289 Academic Press, New York, 1997, pp. 612-637.
- TAYLOR, J.W. & ÖSAPAY, G. (1990) Determining the Functional Conformations of Biologically Active Peptides. Acc. Chem. Res. 23: 338-344.
- THOMPSON, L. D.; Pantoliano, M. W. & Springer, B. A. (1994) Energetic Characterization of the basic Fibroblast Growth Factor - Heparin Interaction: Identification of the Heparin-binding Domain. Biochemistry 33:3831-3840.
- TILLEY, J.W. et al. & Cook, C. (1992) Analogs of Ac-CCK-7 incorporating dipeptide mimics in place of Met²⁸-Fly²⁹. **J. Med. Chem. 35**: 3774-3783.
- TONIOLO, C. (1990) Conformationally restricted peptides through short-range cyclization. Int. J. Peptide Protein Res. 35 (4): 287-300.
- ULRICH, A. & SCHLESSINGER, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell 61**: 203-212.
- VAKSER, I.A. (1996). Main-chain complementarity in protein-protein recognition. **Protein Engineering 9** (9): 741-744.
- VARANDA, L. & MIRANDA, M.T.M. (1997) Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis conditions of unsulfated cholecystokinin-12. J. Peptide Res. 50 (2): 102-108.
- VENKATARAMAN, G., Raman, R., Sasisekharan, V. & Sasisekharan, R. (1999) Molecular characteristics of fibroblast growth factor-fibroblast growth factor receptor-heparin like glycosaminoglycan complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (7): 3658-3663
- VENKATARAMAN, G., Shriver, Z. Davis, J.C. & Sasisekharan, R. (1999) Fibroblast growth factors 1 and 2 are distinct in oligomerization in the presence of heparin-like glycosaminoglycans. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96**: 1892-1897.
- VERBER, D.F., Freidenger, R., Perlow, D.S., Paeveda, W.J., Jr., Holly, F.W., Strachan, R.G., Nutt, R.F., Arison, B.H., Homnick, C., Randall, W.C., Glitzer, M.S., Saperstein, R. & Hirschmann, R. (1981) A potent cyclic analog of somatostatin. Nature 292: 55-57.
- VLODAVSKY, I. (1991) Extra-cellular sequestration and release of fibroblast growth factor: A Regulatory Mechanism? **Trends Biochem. Sci. 16**: 268-271.
- VOLKIN, D.B.; Tsai, P.K.; Dabora, J.M.; Gress, J.O.; Burke, C.J.; Linardt, R.J. & Middaugh, C.R. (1993) Physical stabilization of acidic Fibroblast Growth Factor by polianions. Arch. Biochem. Biophys. 300: 30-41.
- VOLKIN, D.B.; Verticelli, A.M.; Marfia, K.E.; Burke, C.J.; Mach, H. & Middaugh, C.R. (1993) Sucralfate and soluble sucrose octassulfate bind and stablize acidic Fibroblast Growth Factor. **Biochim. Biophys. Acta. 1203**: 18-26.
- WAKSMAN, G. & HERR, A.B. (1998) New insights into heparin-induced FGF oligomerization. Nat. Struct. Biol. 5 (7): 527-530.
- WANDELAN, C,V.; Zeikus, R. & Tsou, D. Cleavage, deprotection and isolation of peptide after Fmoc synthesis. Milligen/Biosearch - Chemistry Update - Division Millipore, 1989, p. 15.
- WANG, F., Kan, M., McKeehan, K., Jang, J-H., Feng, S. & McKeehan, W.L. (1997) A homeointeraction sequence in the ectodomain of the fibroblast growth factor receptor. J. Biol. Chem. 272 (38): 23887-23895.
- WANG, F., Lu, W., Mckeehan, K., Mohamedali, K., Gabriel, J.L., Kan, M. & Mckeehan, W.L. (1999) Common and specific determinants for fibroblast growth factors in the ectodomain of receptor kinase complex. **Biochemistry 38**: 160-171.
- WANG, F.; Kan, M.; Xu, J.; Yan, G. & McKeehan, W. (1995) Ligand-specific structural domains in the fibroblast growth factor receptor. J. Biol. Chem. 270: 10222-10230.
- WANG, Y & KUCZERA, K. (1996) Molecular Dynamics Simulations of Cyclic and Linear DPDE: Influence of the Dissulfide Bond on Peptide Flexibility. J. Phys. Chem. 100: 2555-2563.

WELLS, J.A. (1996) Hormone Mimicry. Science 273: 449-450.

WELLS, J.A. (1996) Binding in the growth hormone receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93**: 1-6.

- WILLIS, K. & SZABO, A.G. (1992) Conformation of parathyroid hormone: Time-resolved fluorescence studies. **Biochemistry 31**: 8924-8931.
- WILSON, S.R. & CUI, W. (1990) Applications of simulated annealing to peptides. **Biopolymers 29**: 225-235.
- WISHART, D.S.; Sykes, B.D. & Richards, F.M. (1992) The techinical shift index: a fast and simple method spectroscopy. **Biochemistry 31**: 1647-1651.
- WISHART, D.S., Bigam, C.G., Holm, A., Hodges, R.S. & Sykes, B.D. (1995) ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of common amino acids. I. Invetigations of nearest neighbor effects. **J. Biomol. NMR 5**: 67-81.
- WONG, P.; Hampton, B.; Szylobryt, E.; Gallagher, A.M.; Jaye, M. & Burgess, W.H. (1995) Analysis of putative heparin-binding domains of fibroblast growth factor-1. Using site-directed mutagenesis and peptide analogues. J. Biol. Chem. 270 (43), 25805-25811.
- WOOD, S.J. & WETZEL, R. (1992) Novel cyclization chemistry especially suited for biologically derived, unprotected peptides. **Int. J. Peptide Protein Res. 39**: 533-539.
- WRIGHTON, N.C.; Farrell, F.X.; Chang, R., Kashyap, A.K.; Babone, F.P.; Mulcahy, L.S.; Johnson, D.L.; Barrett, R.W.; Jolliffe, L.K. & Dower, W.J. (1996) Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. Science 273: 458-463.
- WU, C.S. & YANG, J.T. (1980) Helical conformation of glucagon in surfactant solutions. **Biochemistry 19**: 2117-2122.
- WU, C.S., Ikeda, K. & Yang, J.T. (1981) Ordered conformation of polypeptides and proteins in acidic dodecil sulfate solutions. **Biochemistry 20**: 566-570.
- WÜTRICH, K. *Nuclear Magnetic Ressonance of Proteins and Nucleic Acids*. John Willey & Son Ed., New York, 1986.
- XIE, P., Zhou, Q. & Diem, M. (1995) Conformational studies of β-turns in cyclic peptides by vibrational CD. **J. Am. Chem. Soc. 117**: 9502-9508.

- XU, J.; Nakahara, M.; Crabb, J.W.; Shi, E.; Matuo, Y.; Fraser, M.; Kan, M.; Hou, J. & McKeehan, W.L. (1992) Expression and imunochemical analysis of rat and human fibroblast growth factor receptor (flg) isoforms. J. Biol. Chem. 267 (25): 17792-17803.
- XUE, C.-B.; McKinney,A.; Lu, H.-F.; Jiang, Y.; Becker, J.M. & Naider, F. (1996) Probing the functional conformation of the tridecapeptide mating pheromone of *Saccharomyces cerevisae* through study of disulfide-constrained analogs. Int. J. Peptide Protein Res. 47:131-114.
- YAMAMOTO, Y.; Katow, H. & Sofuku, S. (1993) Design and Synthesis of Cyclic Fibronectin Related Peptides, RGDSPASS Containing Cystine Peptides. **Chem. Lett.**, pp. 605-608.
- YAYON, A., Aziezer, D., Safran, M., Gross, J.L., Heldmann, Y., Cabilly, S., Givol, D. & Katchalski-Katzir, E. (1993) Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90**: 10643-10647.
- YAYON, A.; Kagsbrun, M.; Esko, J.D.; Leder, P. & Ornitz, D.M. (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its High Affinity Receptor. **Cell 64**: 841-848.
- ZHANG, Y., Gorry, M.C., Post, J.C. & Ehrlich, G.D. (1999) Genomic organization of human fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR 2) gene and comparative analysis of the human FGFR gene family. **Gene 230**: 69-79.
- ZHONG, L. & JOHNSON, Jr, W.C. (1992) Environment affects amino acid preference for secondary structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89**:4462-4465.
- ZHU, H., Anchin, J., Ramnarayan, K., Zangh, J., Kawai, T., Mong, S. & Wolff, M.E. (1997) Analysis of high-affinity binding determinants in the receptor binding epitope of basic fibroblast growth factor. **Protein Engineering 10** (4): 417-421.
- ZHU, H.; Ramnarayan, K.; Anchin, J.; Miao, Y.N.; Sereno, A.; Millman, L., Zheng, J., Balaji, V.N. and Wolff, M.E. (1995) Glu 96 of basic FGF is essential for high affinity receptor binding. Identification by structure-based site directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 270 (37): 21869-21874.
- ZHU, Z.; Komiya, H.; Chirino, A.; Faham, S.; Fox, G.M.; Arakawa, T.A.A.; Hsu, B.T. & Rees, D.C. (1991) Three-dimensional Structures of acidic and basic Fibroblast Growth Factors.
 Science 251: 90-93.

ABSTRACT

In our search for small potent agonists or inhibitors related to hFGF-1(97-132), we first investigated the preferred conformation in solution of Ac-WFVGLKKNGSSKRGPRT-NH₂ (I), by ¹H-NMR. This compound has been described as a weak agonist of the mitogenic activity of this growth factor able to inhibit the binding of ¹²⁵I-hFGF-1 to their cellular receptors, and to heparin-Sepharose columns (Oyama et al., 1996). We found that this peptide is in a random coil configuration, which could explain its low activity (10⁴ times less potent than the native protein).

On the basis on these results and on several data available in the literature (Harper & Lobb 1988; Burgess et al., 1991; Pantoliano et al., 1994, Springer et al., 1994; Thompson et al., 1994; Imamura et al., 1995; Ornitz et al., 1996; Blaber et al., 1996; Zhu et al., 1991, 1995; 1997; Schwizer, 1995; Sieber & Moe, 1996; Rizo et al., 1996), we designed seventeen peptides related to the Site 2 (97-132)[hFGF-1] listed on the **Table 1**: some were linear and some were cyclic.

Table 1: Peptides related to hFGF-1 Site 2 which were studied in the present work					
	97	110		120	132
Síte 2 [hFGF-1]	Y I S K K H A E K N W F	VGLKKN	GSCKRG	PRT <mark>H</mark>	YGQKAILF
1	Ac- WF	VGLKKN	GSSKRGI	PRT -NH	Ł
II	Ac-HAEKNWF	-NH ₂			
	Ac-SKKHAEKNWF	-NH ₂			
IV	c(1-5)[Ac-C K K H C E K N W F	-NH ₂]			
V	c(1-5)[Ac-C K K H C E K - W F	-NH ₂]			
VI	Ac-S K K H A -NH ₂				
VII	c(1-5)[Ac-C K K H C-NH ₂]				
VIII	c(5-14)[Ac-S K K H E E K N W F	VGLKK-N	H_2		
IX	c(1-5)[Ac-D K K H X E K N W F]	-NH ₂			
X	Ac- WF	V G L K - N	IGSSKRG	PRT- <mark>N</mark> F	\mathbf{I}_2
XI	Ac- WF	VGL P	S K R - N	H_2	
XII	c(4-7)[Ac- WF]	VCL P	C K R - N	H_2	
XIII	c(3-7)[Ac- WF	CGL - P	C K R - N	H_2	
XIV	Ac- WF	VGL P	S K R G I	PRT -NH	H 2
XV	c(3-13)[Ac- W F	CGL P	S K R G I	PRC-NH	<u>4</u> 2]
XVI	Ac-WF	VGLKAN	GSSKRGI	PRT -NH	H 2
XVII	Ac- WF	VGLAKN	GSSKRGI	PRT -NH	I 2

(X) = diaminobutiric acid; (-) = deletion of amino acid residue; c = cyclo

They were synthesized manually using the solid phase method, purified by RP-HPLC, and chemically characterized by RP-HPLC, amino acid analysis and mass spectrometry. Conformational constraints of certain peptides were achieved by cyclization. Intramolecular dissulfide bonds were formed by the oxidation of the thiol groups of two cysteins residues with air oxigen and/or $K_2Fe(CN)_6$. Lactama bonds were formed between the functional side chain group of acidic and basic residue.

The synthetic peptides were tested in of their ability to inducing mitogenic response on Balb/c 3T3, A-31 clone fibroblasts cultures. The results obtained were the following: 1) peptides **II**, **III**, **VI-IX** were essentially inactive on Balb/c 3T3 fibroblasts in the range of concentrations used (up to 200 μ M), 2) in the same range of concentration, peptide **IV** showed an ED₅₀ ~60 μ M (similar to that found for peptide **I**) while its correspondent linear analog (**III**) was inactive; 3) **V**, analog of **IV**, that has Asn deleted, exibihited mitogenic activity lower than **IV**; 4) **X** showed a mitogenic activity on Balb/c fibroblasts lower than **I**, 5) cyclic peptides **XII** and **XV** showed mitogenic activities similar to that of **I**, while their correspondent linear (**XI** and **XIV**) and cyclic (**XIII**) analogs were inactive; 6) **XVI** and **XVII** showed mitogenic activities similar to that found for **I**.

In parallel, two peptides [Ac-¹⁷⁰NTTDKENEVLH¹⁸⁰-NH₂ (XVIII) and Ac-

¹⁹⁴SLAGNSIGLSH²⁰⁴-NH₂ (**XIX**)], derived from DIII FGFR-1 β and designed as putative ligands of Site2 hFGF-1, were synthesized and tested. In the range of concentration used (up to 200 μ M), **XIX** was inactive and exhibited no inhibitory effect on FGF-1 and FGF-2 mitogenic activities. Nevertheless, **XVIII** inhibited the mitogenic activity of both proteins, being this effect clearly more significant for the FGF-2 (Kiyota et al., 1998).Some of synthetic peptides have been spectroscopically analyzed in order to disclose the structural features that characterize the active (Kiyota et al., 1999).

A detailed analysis was undertaken with peptides III and IV using circular dichroism (CD) and ¹H-NMR. Although the similarities in their primary sequences, **III** has shown inactive when tested on Balb/c 3T3 fibroblasts culture while IV was mitogenic with ED₅₀ values around 50 µM. I was also not capable of inhibiting the binding of hFGF-1 to its cellular receptors, I was inactive while **II** inhibits it with ID₅₀ values of about 30 µM. Circular dichroism study showed that while at increasing SDS concentrations the spectra of III suggested the presence of an equilibrium among partially structured states, those of IV indicated that this peptide exists in unordered extended conformation, folds into a β -conformation and, finally, assumes a helix rich structure. ¹H-NMR analysis revealed the existence of a well defined γ -turn encompassing residues 4-6 that nicely fits with that present in the same portion of the crystallized hFGF-1. Superposition of the final structures of **III** and **IV** over the entire sequence revealed that only the C-terminal portion of **III** has the tendency to fold into a regular structure. Together these data indicate that the turn existence in IV allowed it to acquire the structural determinants for the expression of mitogenicity probably through a more appropriate arrangement of residues 8-10. More importantly, they demonstrate that we have found a short agonist of hFGF-1 able to structurally mimic its corresponding stretch.

Conformational analysis of **XVIII** in solution was undertaken also by using CD e ¹H-RMN. The results obtained indicated that it has a strong tendency to assume helicoidal configuration in aqueous solution containing 50% CD₃OH.

Altogether these data led us to conclude that: 1) the presence of Asn^{106} adjacent to hydrophobic core constituted by W¹⁰⁷F¹⁰⁸ is essential for the mitogenic activity of **IV**; 2) conformation constraint by cyclization was efficient for the correct N¹⁰⁶, W¹⁰⁷ and F¹⁰⁸ side chains orientation in peptide **IV** for an effective cellular receptors binding; 3) peptides related to hFGF-1 (114-123) seem to be promising mitogenic agonists; 4) the only one lysine between L126 and N129 is enough for the mitogenic activity expression (**X**, **XVI** and **XVII**); 5) deletions of residues, replacement of deleted fragment by Pro followed by restriction of peptide conformation might keep the frame of the residues considered essential for the mitogenic activity observed in peptide **XVIII** was indicative that the loop DE of DIII FGFRs seems to be involved in the binding of this protein. These conclusions are very relevant in terms of the knowledge of the structural requirements for the mitogenic activity of studied peptides and, as a reflex, of the hFGF-1. Furthermore, they constitute additional guidelines for designing new constrained peptides derived from this segment of FGF-1, which may result in more potent agonists, antagonists or inhibitors of such important target.