

BIBLIOTECA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Univ. de São Paulo

19.631

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

***Peptídeos mitogênicos ou inibidores da atividade do  
Fator de Crescimento de Fibroblastos-1 humano  
baseados no complexo FGF/receptor/heparina***

**SÉRGIO OYAMA JÚNIOR**

Tese de Doutorado submetida ao Departamento  
de Bioquímica do Instituto de Química -  
Universidade de São Paulo

**SÃO PAULO**

**2001**

*“Peptídeos Mitogênicos ou Inibidores da Atividade  
do Fator de Crescimento de Fibroblastos-1 Humano  
Baseados no Complexo FGF/Receptor/Heparina”*

***SÉRGIO OYAMA JÚNIOR***

*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.*

Aprovado por:

---

Prof. Dr. ANGELO GERALDO GAMBARINI  
IQ - USP  
(Orientador e Presidente)

---

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR  
IQ - USP

---

Profa. Dra. ANA CLAUDIA RASERA DA SILVA  
IQ - USP

---

Prof. Dr. LAERTE DE OLIVEIRA  
UNIFESP

---

Prof. Dr. JAIR RIBEIRO CHAGAS  
UMC

SÃO PAULO  
11 DE ABRIL 2001.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

***Peptídeos mitogênicos ou inibidores da atividade do  
Fator de Crescimento de Fibroblastos-1 humano  
baseados no complexo FGF/receptor/heparina***

**SÉRGIO OYAMA JÚNIOR**

Tese de Doutorado submetida ao Departamento  
de Bioquímica do Instituto de Química -  
Universidade de São Paulo

**Orientador: Dr. Angelo G. Gambarini**

**Co-orientadora: Dra. Maria Terêsa M. Miranda**

**SÃO PAULO**

**2001**

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

O99p Oyama Júnior, Sérgio  
Peptídeos mitogênicos ou inibidores da atividade do fator  
de crescimento de fibroblastos-1 humano baseados no  
complexo FGF/receptor/heparina / Sérgio Oyama Júnior. --  
São Paulo, 2001.  
66p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade  
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador: Gambarini, Angelo Geraldo  
Co-orientador: Miranda, Maria Terêsa Machini

1. Proteína: Interação molecular: Bioquímica 2. Peptídeo:  
Síntese: Química orgânica I. T. II. Gambarini, Angelo  
Geraldo, orientador III. Miranda, Maria Terêsa Machini,  
co-orientador.

574.19245 CDD



**Aos meus pais, Sérgio e Keiko,  
cujo apoio e compreensão foram de extrema  
importância para a realização deste trabalho.**

---

## **AGRADECIMENTOS**

Devo meus agradecimentos ao Angelo Gambarini, pelo seu entusiasmo com o trabalho, incentivo nos momentos difíceis, compreensão em relação às minhas deficiências e, principalmente, pela orientação segura e contribuição à minha formação.

Às Dras. Maria Terêsa Miranda e Wlândia Viviani, que contribuíram ativamente para a realização deste trabalho. A Dra. Maria Terêsa coordenou os trabalhos de síntese, purificação e análise dos peptídeos e a Dra. Wlândia forneceu os dados de modelagem molecular. Devo agradecer ainda as importantes discussões para a interpretação dos dados biológicos obtidos.

À Izaura N. Toma, pela sua importante colaboração profissional em todos os procedimentos experimentais realizados durante este trabalho. Agradeço também a companhia, amizade e o apoio pessoal.

Aos amigos do laboratório Marcelo, Cléber, Cléria, Marcos, Neuzinha, Klaus, Guto pela convivência agradável, sugestões e apoio.

Ao Dr. Hugo Armelin, por ter-me aberto as portas de seu laboratório, viabilizando a realização dos ensaios biológicos com os peptídeos sintéticos. Agradeço ainda as importantes discussões realizadas por ocasião dos seminários do grupo. Devo um especial agradecimento a todas as pessoas do laboratório, Dra. Claudimara Loft, Alexandre, Fábio, Ivan, Ana Paula, Kátia, Érico e Telma, que foram extremamente atenciosos e solidários durante todo este período.

À Dra. Mari Cleide Sogayar e seu grupo de trabalho, pelas valiosas críticas e sugestões dadas por ocasião dos seminários do grupo.

Ao Dr. Kouki Kitagawa do Niigata College of Pharmacy, Japão, pelas análises de espectrometria de massa.

Ao Dr. Paulo Lee Ho e à Patrícia, do Instituto Butantan, por suas sugestões, críticas e interesse demonstrado pelo trabalho.

Ao CNPq, Fapesp e Finep pelos auxílios concedidos

---

## **ABREVIATURAS**

**A – Alanina**

**Ac – Grupo Acetil**

**ACN – Acetonitrila**

**AIGF – “Androgen-Induced Growth Factor”**

**BSA – Albumina Sérica Bovina**

**C – Cisteína**

**CHO – Células “Chinese Hamster Ovary”**

**CPM – Contagem por Minuto**

**CVFF – “Consistent Valence Force Field”**

**D – Ácido Aspártico**

**DCM – Diclorometano**

**DIPCDI – Diisopropilcarbodiimida**

**DMEM – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco**

**E – Ácido Glutâmico**

**ED<sub>50</sub> – 50% da Dose Estimulatória Máxima**

**EGF – “Epidermal Growth Factor”**

**EPOR – Receptor da Eritropoietina**

**F – Fenilalanina**

**FAB-MS – “Fast Atom Bombardment – Mass Spectrometry”**

**FCS – Soro Fetal Bovino**

**FGF – “Fibroblast Growth Factor”**

**FGFR – “Fibroblast Growth Factor Receptor”**

**G – Glicina**

**GlcNS, 6S – Glicosoamina N, 6-Dissulfatada**

**GlcUA – Ácido Glicurônico**

**H – Histidina**

**HF – Fluoreto de Hidrogênio**

**HGF – “Hepatocyte Growth Factor”**

**HGH – “Human Growth Hormone”**

**HOBt – 1-Hidroxibenzotriazol**

**HS – Heparan Sulfato**

I – Isoleucina  
ID<sub>50</sub> – 50 % da Dose Inibitória Máxima  
IdoUA, 2S – Ácido Idurônico-2-Sulfatado  
IGF – “Insulin-like Growth Factor”  
K – Lisina  
KGF – “Keratinocyte Growth Factor”  
L – Leucina  
M – Metionina  
MAPKs – “Mitogen Activated Protein Kinases”  
MBHA – p-metilbenzidrilamino  
N – Asparagina  
NMP – n-Metilpirrolidona  
P – Prolina  
PBS – “Phosphate-Buffered Saline”  
PDB – “Protein Data Bank”  
PDGF – “Platelet Derived Growth Factor”  
PLC- $\gamma$  - Fosfolipase- $\gamma$   
Q – Glutamina  
R – Arginina  
RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa  
S – Serina  
T – Treonina  
TCA – Ácido Trifluoroacético  
TEA – Trietilamina  
TEAP – “Triethylammonium Phosphate Buffer”  
TFA – Ácido Trifluoroacético  
TNF – “Tumor Necrosis Factor”  
V – Valina  
W – Triptofano  
Y – Tirosina

---

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                        | 01 |
| 1.1. Histórico .....                       | 03 |
| 1.2. A Família dos FGFs .....              | 04 |
| 1.3. Estrutura Primária .....              | 05 |
| 1.4. Estrutura Terciária .....             | 06 |
| 1.5. Domínios Estruturais dos FGFRs .....  | 08 |
| 1.6. Heparina e Heparan Sulfato (HS) ..... | 11 |
| 1.7. Transdução de sinal .....             | 13 |
| 1.8. Objetivos .....                       | 14 |
| <br>                                       |    |
| 2. METODOLOGIA .....                       | 15 |
| 2.1. Modelagem Molecular .....             | 15 |
| 2.2. Síntese de Peptídeos .....            | 15 |
| 2.2.1. Acoplamento.....                    | 15 |
| 2.2.2. Desproteção e Neutralização .....   | 17 |
| 2.2.3. Monitoramento .....                 | 17 |
| 2.2.4. Clivagem do Peptídeo-Resina .....   | 17 |
| 2.3. Purificação .....                     | 17 |
| 2.4. Caracterização Química .....          | 18 |
| 2.4.1. Estimativa do Grau de Pureza .....  | 18 |
| 2.4.2. Análise de Aminoácidos .....        | 18 |
| 2.4.3. Espectrometria de Massa .....       | 19 |
| 2.5. Ensaio Mitogênico .....               | 19 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>3.1. Proposição de um modelo tridimensional teórico para os domínios extracelulares do FGFR-1<math>\beta</math></b> ..... | <b>21</b> |
| <b>3.1.1. Alinhamento do Domínio DII</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>3.1.2. Alinhamento do Domínio DIII</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>3.1.3. Segmento Conectivo</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>3.1.4. Avaliação da Estrutura Final</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>3.2. Desenho, Síntese e Atividade Biológica de peptídeos relacionados ao FGFR-1<math>\beta</math></b> .....               | <b>30</b> |
| <b>3.2.1. Desenho</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>3.2.2. Síntese, purificação e caracterização de peptídeos</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>3.2.3. Atividade Biológica</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>3.3. Análise da estrutura tridimensional do hFGF-1</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>3.3.1. Domínios estruturais dos FGFs</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>3.4. Desenho, Síntese e Atividade Biológica de peptídeos relacionados ao hFGF-1</b> .....                                 | <b>41</b> |
| <b>3.4.1. Desenho</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>3.4.2. Análise conformacional teórica</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>3.4.2.1. Dímeros</b> .....  | <b>44</b> |
| <b>3.4.2.2. Semi-cíclicos ou cíclicos</b> .....  | <b>44</b> |
| <b>3.4.2.3. Bicíclicos</b> .....   | <b>44</b> |
| <b>3.4.2.4. Peptídeos selecionados para síntese</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>3.4.3. Síntese de Peptídeos</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>3.4.4. Atividade Biológica</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>3.5. Avaliação Final</b> .....  | <b>52</b> |
| <b>3.5.1. Modelo teórico e peptídeos relacionados à estrutura do FGFR-1<math>\beta</math></b> .....                          | <b>52</b> |
| <b>3.5.2. Peptídeos relacionados à estrutura do FGF-1</b> .....  | <b>55</b> |
| <b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>58</b> |

---

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

|                 |    |
|-----------------|----|
| Figura 1 .....  | 02 |
| Figura 2 .....  | 02 |
| Figura 3 .....  | 06 |
| Figura 4 .....  | 07 |
| Figura 5 .....  | 08 |
| Figura 6 .....  | 10 |
| Figura 7 .....  | 11 |
| Figura 8 .....  | 12 |
| Figura 9 .....  | 13 |
| Figura 10 ..... | 16 |
| Figura 11 ..... | 20 |
| Figura 12 ..... | 21 |
| Figura 13 ..... | 22 |
| Figura 14 ..... | 25 |
| Figura 15 ..... | 29 |
| Figura 16 ..... | 30 |
| Figura 17 ..... | 31 |
| Figura 18 ..... | 33 |
| Figura 19 ..... | 33 |
| Figura 20 ..... | 36 |
| Figura 21 ..... | 37 |
| Figura 22 ..... | 40 |
| Figura 23 ..... | 46 |
| Figura 24 ..... | 49 |
| Figura 25 ..... | 49 |
| Figura 26 ..... | 51 |
| Figura 27 ..... | 53 |
| Figura 28 ..... | 53 |
| Figura 29 ..... | 54 |

|                |    |
|----------------|----|
| Tabela 1 ..... | 33 |
| Tabela 2 ..... | 33 |
| Tabela 3 ..... | 33 |
| Tabela 4 ..... | 48 |
| Tabela 5 ..... | 48 |
| Tabela 6 ..... | 48 |
| Tabela 7 ..... | 56 |



## RESUMO

Os Fatores de Crescimento de Fibroblastos ("Fibroblast Growth Factors"; FGFs) participam de fenômenos biológicos de grande importância, tais como migração, divisão e diferenciação celulares. O presente trabalho teve como objetivo central a busca de compostos biologicamente ativos através de um desenho racional de peptídeos derivados do FGF-1 e do seu receptor (FGFR-1).

A partir da análise dos dados disponíveis na literatura, aliada a técnicas de modelagem molecular, foram desenhados, sintetizados e testados dois grupos de peptídeos.

O primeiro conjunto (R1 - R3) é constituído por peptídeos lineares derivados do FGFR-1. Os ensaios de atividade mitogênica dos FGFs 1 e 2 em presença dos peptídeos mostram que R1 e R2 foram capazes de inibir a ação mitogênica do FGF-1. Este efeito é seletivo, já que a atividade do FGF-2 não é afetada. A atividade inibitória é dose-dependente para ambos os peptídeos. Os resultados mostram ainda que o efeito é sequência-dependente, já que o peptídeo R3, correspondente à porção C-terminal de R2, é inativo. Por outro lado, o segmento N-terminal de R2 (representado por R1) é suficiente para desencadear o mesmo nível de inibição apresentado pelo peptídeo R2 inteiro.

Os peptídeos sintéticos semi-cíclicos F1 - F3, correspondentes a um importante sítio de ligação no FGF-1, foram avaliados quanto à sua capacidade de estimular a síntese de DNA em fibroblastos em cultura. Os dados obtidos mostram que, na faixa de concentração testada (0,1 a 200  $\mu$ M), o peptídeo F1 é inativo. O peptídeo F2 apresentou atividade mitogênica ( $ED_{50} = 60 - 70 \mu$ M), estimulando a incorporação de timidina tritiada em até 66 % do valor máximo induzido por 10 % de soro fetal bovino. Na mesma faixa de concentração, o peptídeo F3 apresentou atividade em níveis inferiores ( $ED_{50} > 100 \mu$ M) aos apresentados pelo peptídeo F2. Estes resultados indicam que os peptídeos F2 e F3 poderiam mimetizar a superfície correspondente a um sítio de ligação do FGF-1 ao receptor. Além disso, o fato de F2 ser mais ativo que F3 indica que, além dos resíduos hidrofóbicos Y e L (presentes em ambos), o resíduo R presente em F2 exerce um importante papel para a atividade mitogênica do peptídeo. Como já proposto por nós em trabalhos anteriores, os dados apresentados indicam que é possível obter compostos com atividade mitogênica através do desenho racional de estruturas peptídicas derivadas dos FGFs. A análise do conjunto de peptídeos estudados até o momento revela a existência de características químicas comuns a todos aqueles que se mostraram mitogênicos, ou seja, a presença de um núcleo hidrofóbico flanqueado por resíduos polares carregados.

## SUMMARY

The Fibroblast Growth Factors (FGFs) are involved in very important biological processes like cell migration, division and differentiation. The aim of this work was the search of biologically active compounds through a rational design of peptides derived from FGF-1 and its receptor (FGFR-1).

On the basis on several data available in the literature and with the aid of molecular modeling techniques, we designed, synthesized and tested two sets of peptides.

The first group (R1-R3) is composed by linear peptides derived from FGFR-1. The mitogenic activity assays of FGF-1 and FGF-2 in the presence of these peptides reveal that R1 and R2 were able to inhibit the mitogenic response elicited by FGF-1. This effect is dose-dependent and selective, since the FGF-2 activity was not affected. Also, the inhibitory activity is sequence-dependent since peptide R3, corresponding to the C-terminal stretch of R2, was inactive. On the other hand, the N-terminal segment of peptide R2, represented by R1, is sufficient to elicit about the same response observed for the longer peptide R2.

The semi-cyclic synthetic peptides F1 - F3, corresponding to an important FGF-1 binding site, were tested for their ability to stimulate DNA synthesis on fibroblast cultures. The results show that F1 is inactive in the range tested (0.1 to 200  $\mu$ M). Peptide F2 was able to elicit a mitogenic activity ( $ED_{50} = 60 - 70 \mu$ M), stimulating the incorporation of [methyl-3H] thymidine to a level corresponding to 66 % of the maximum response induced by 10 % fetal calf serum. In the same range, peptide F3 was less active ( $ED_{50} > 100 \mu$ M). These results suggest that peptides F2 and F3 could mimic a surface corresponding to a receptor binding site of FGF-1. Also, the better performance of F2 could be explained by the presence of the residue R (besides Y and L) that could be important to elicit a mitogenic response. These results, together with those presented in former papers, indicate that it is possible to obtain compounds with mitogenic activity through the rational design of peptides derived from the FGFs. The analysis of the assembly of peptides studied allow us to define a chemical pattern shared by all the mitogenic compounds obtained until now, namely the presence of a hydrophobic core flanked by polar charged residues.

---

## 1. INTRODUÇÃO

Os “Fibroblast Growth Factors” (FGFs) constituem uma família multigênica de proteínas estruturalmente relacionadas composta por pelo menos 18 componentes (FGFs 1-18; Naski & Ornitz, 1998). Os membros desta família são proteínas monoméricas, cujos pesos moleculares podem variar de 16 a 30 KDa. Os fatores pertencentes a esta família apresentam em comum uma grande afinidade pelo glicosaminoglicano sulfatado heparina.

Os FGFs estão envolvidos em fenômenos biológicos de grande importância, tais como migração, divisão e diferenciação celulares.

Embora o exato papel fisiológico dos FGFs ainda não esteja completamente elucidado, sabe-se que estes fatores estão envolvidos nos processos de angiogênese, cicatrização de feridas, sobrevivência e regeneração de neurônios, diferenciação embrionária e produção e secreção de hormônios (**Figura 1**; Baird & Klagsbrun, 1991; Galzie et al., 1997; Naski & Ornitz, 1998).

Por outro lado, a expressão inadequada dos FGFs parece estar relacionada ao desenvolvimento de quadros patológicos diversos, tais como retinopatia diabética, proliferação de tumores, artrite reumatóide e arterioesclerose (Folkman & Klagsbrun, 1987). Da mesma forma, mutações pontuais nas diferentes isoformas dos receptores celulares dos FGFs (FGFRs) estão ligadas ao desenvolvimento anômalo do tecido ósseo, freqüente em síndromes relacionadas à acondroplasia (**Figura 2**; Muenke & Schell, 1995).

Os FGFs associam-se à superfície celular sob a forma de um complexo molecular composto por: (i) o ligante (FGF); (ii) a cadeia polissacarídica do proteoglicano heparam sulfato (HS) ou da heparina; e (iii) os domínios extracelulares de uma proteína transmembranar com atividade intrínseca de tirosina quinase (FGFR). A dimerização dos receptores celulares, obtida pela formação deste complexo, é o evento essencial para o desencadeamento da atividade biológica (Ornitz et al., 1992; Schlessinger et al., 1995).

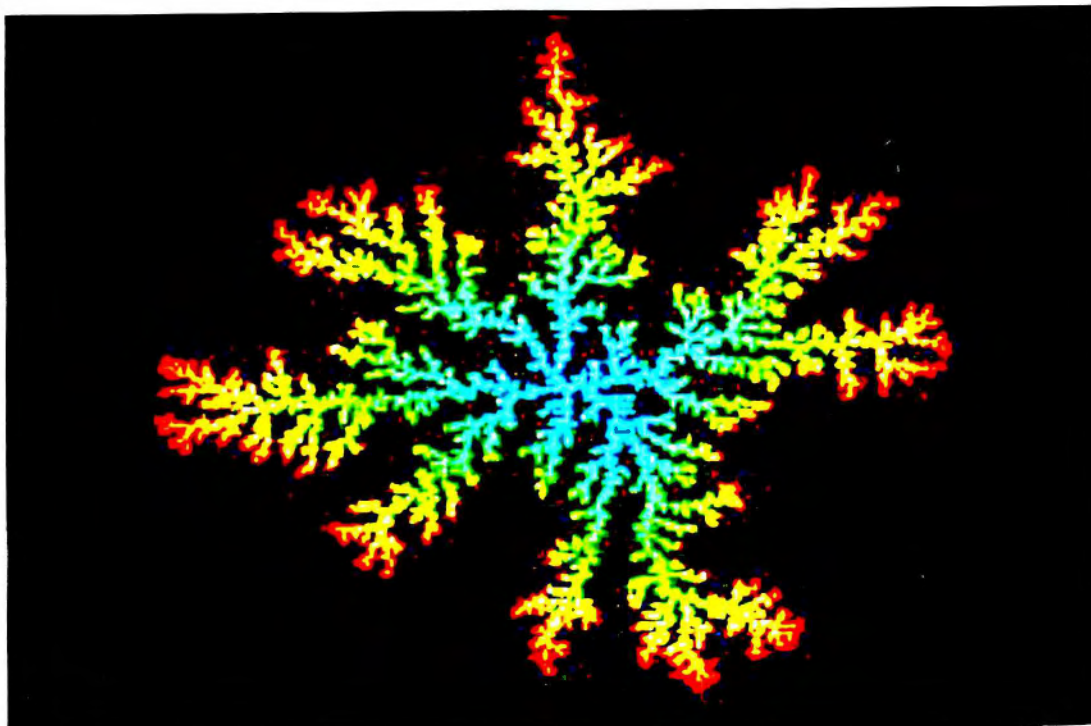


Figura 1. Imagem da progressão de um modelo teórico de angiogênese, gerada em computador. O processo de formação de novos vasos sanguíneos é um dos inúmeros fenômenos biológicos mediados pela ação dos FGFs.

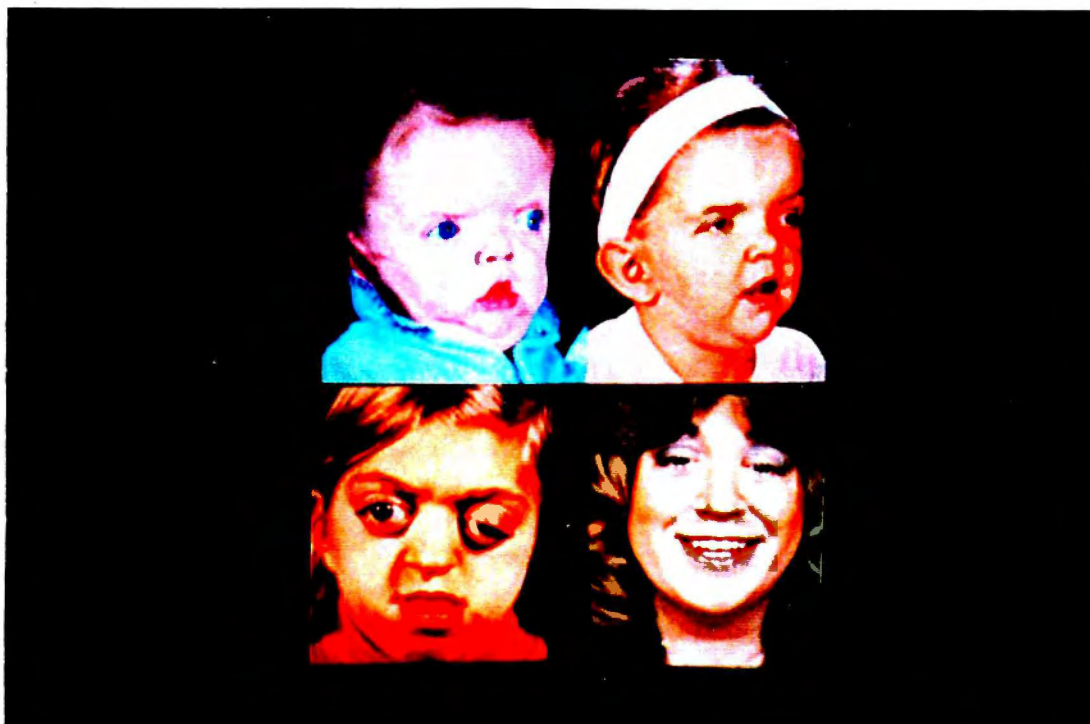


Figura 2. Pacientes portadores da Síndrome de Crouzon, uma enfermidade causada por mutações nos receptores dos FGFs. Uma das características desta síndrome é a fusão prematura das placas cranianas, ocasionando uma série de deformidades cranio-faciais (à esquerda). Felizmente, existem recursos cirúrgicos capazes de amenizar estas anomalias (à direita).



---

## 1.1. Histórico

A noção de que o processo de proliferação celular estaria sendo regulado por fatores solúveis presentes nos tecidos data de mais de sessenta anos atrás. Em um primeiro momento, verificou-se que extratos provenientes de cérebro eram ricas fontes de substâncias capazes de promover a proliferação celular *in vitro* (Trowell et al., 1939; Hoffman, 1940).

Em 1973, Armelin descreveu a ação mitogênica exercida por extratos de glândula pituitária sobre fibroblastos 3T3 e propôs a existência de um fator peptídico regulador da divisão celular. Este fator foi posteriormente purificado e denominado "Fibroblast Growth Factor" (FGF; Gospodarowicz & Moran, 1974).

No entanto, em pouco tempo verificou-se que a ação do FGF não estava restrita à estimulação da proliferação de fibroblastos. Sabe-se atualmente que estes fatores têm a capacidade de estimular ou retardar a divisão e diferenciação de um amplo espectro de tipos celulares de origem mesodérmica e neuroectodérmica (Baird & Klagsbrun, 1991).

Dentre os fatores já descritos, os melhor caracterizados são os FGFs 1 e 2, também denominados FGFs ácido e básico, respectivamente. O FGF-1 (pI = 5,6) foi primariamente identificado por sua habilidade em estimular a proliferação e retardar a diferenciação de mioblastos (Gospodarowicz et al., 1975). Apresentando um caráter básico, o FGF-2 (pI = 9,6) foi a princípio isolado por sua capacidade de estimular a proliferação e transformação fenotípica de fibroblastos Balb/c 3T3 (Gospodarowicz, 1974; Gospodarowicz & Moran, 1974). Desde então, inúmeros fatores com atividades semelhantes foram isolados a partir de vários tecidos. Inicialmente descritos como entidades moleculares diferentes, estes fatores foram posteriormente caracterizados e identificados como formas idênticas aos FGFs 1 ou 2 (revisto por Burgess & Maciag, 1989). Atualmente sabe-se que estas proteínas e seus receptores encontram-se amplamente distribuídas em tecidos normais e/ou tumorais de mamíferos (Baird et al., 1986).

---

## 1.2. A Família dos FGFs

Após a caracterização dos FGFs 1 e 2, um crescente número de proteínas estruturalmente relacionadas vem sendo descrito. A seguir, apresentamos alguns dos membros desta família.

O FGF-3 (Moore et al., 1986) é o produto do oncogene *int-2* e sua expressão restringe-se a determinadas etapas do desenvolvimento embrionário. Este fator é capaz de promover a proliferação de certas linhagens celulares dependentes de FGF-2.

O FGF-4 ou k-FGF (Delli Bovi et al., 1988) também constitui-se no produto de um gene regulado durante a fase de desenvolvimento embrionário (*hst-1*). Este fator foi inicialmente detectado em uma grande variedade de tumores humanos, tais como os de estômago e cólon, carcinomas hepáticos e sarcomas de Kaposi (daí a denominação k-FGF). O FGF-4 apresenta grande potencial tumorigênico, aparentemente através de um mecanismo de ação autócrina. Além disso, sabe-se que esta proteína é um potente fator angiogênico.

O FGF-5 (Zhan et al., 1988) é expresso em vários tecidos de embriões de mamíferos. Em animais adultos, sua ocorrência é observada em neurônios do sistema nervoso central e células do músculo esquelético. Este fator apresenta atividade mitogênica sobre fibroblastos e células endoteliais, além de servir como fator trófico para neurônios serotoninérgicos e colinérgicos. Tem-se sugerido que o FGF-5 esteja envolvido no desenvolvimento autócrino de sarcomas de Kaposi relacionados à AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

FGF-6 (Marics et al., 1989), também conhecido como o produto do oncogene *hst-2*, tem atividade transformante sobre fibroblastos NIH 3T3. Uma vez injetadas em camundongos, estas células têm a capacidade de induzir a formação de tumores sólidos vascularizados, o que sugere a participação do FGF-6 no processo de angiogênese. Além disso, esta proteína tem a capacidade de, *in vitro*, tornar o crescimento de fibroblastos independente de ancoragem. FGF-6 é um potente fator mitogênico sobre fibroblastos, ao passo

que sua ação sobre células endoteliais ou melanócitos é significativamente menor.

FGF-7 ou KGF (Keratinocyte Growth Factor; Finch et al., 1989) é expresso por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo fibroblastos e células do músculo liso. O KGF liga-se a um subtipo do receptor FGFR-2. Ao contrário dos demais membros da família dos FGFs, o FGF-7 e seu receptor apresentam uma distribuição aparentemente restrita às células especializadas da epiderme, denominadas queratinócitos. Durante a cicatrização de feridas, observa-se um aumento na secreção de KGF e expressão do receptor, o que indica que este fator seja importante para a proliferação de células epiteliais.

Os FGFs 8 (AIGF; Tanaka et al., 1992) e 9 (Miyamoto et al., 1993) são menos estudados. O FGF-8, ou "Androgen-Induced Growth Factor" foi inicialmente isolado a partir de células de carcinoma mamário estimuladas por testosterona. O FGF-9 foi descoberto a partir do meio de cultura de uma linhagem celular derivada de glioma humano. Esta proteína tem propriedades oncogênicas quando o gene que a codifica é transfectado em fibroblastos de camundongo.

---

### 1.3. Estrutura Primária

Os FGFs 1 e 2 foram isolados e purificados à homogeneidade, tiveram suas composições em aminoácidos determinadas e seus cDNAs clonados e sequenciados (revisto por Gospodarowicz et al., 1986; Burgess & Maciag, 1989). A sequência completa do FGF-1 humano de 155 resíduos conforme descrito por Jaye e cols. (1986) está apresentada na **Figura 3**. A sequência da forma nativa do FGF-2 bovino contendo 155 resíduos foi elucidada por Abraham e cols. (1986).

O fato de ambas as moléculas apresentarem um espectro de ação e um conjunto de células-alvo bastante similares pode ser explicado pelo alto grau de homologia encontrado entre as duas proteínas. Os FGFs 1 e 2 apresentam cerca de 55% de homologia quanto à sua estrutura primária (Gimenez-Gallego



et al., 1985). Pode-se observar ainda a existência de várias mutações conservativas ao longo da estrutura primária das duas moléculas.

Os vários membros da família dos FGFs apresentam de 30 a 55 % de homologia entre suas estruturas primárias (Miyamoto et al., 1993). O alinhamento de 9 das 18 sequências conhecidas até o momento (**Figura 3**) revela uma grande conservação de resíduos envolvidos em prováveis sítios de ligação ao receptor e à heparina.

|   |            |   |    |            |                   |               |                          |              |                     |         |             |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
|---|------------|---|----|------------|-------------------|---------------|--------------------------|--------------|---------------------|---------|-------------|-------------|---|---|------|------|-----|------|------|------|------|---|---|---|
|   |            | S | TT |            | S                 |               |                          |              |                     | T       |             |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 1 | PCNYRKPRL  | Y | C  | SN         | C-GHFLRILPDGTVDT  | R             | DRSDQHIQLQLSAESVGEVYIKST | ET           | GQYLAMDTDC          | L       | LYGSQTPNBE  |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 2 | PCHFDPKRL  | Y | C  | KN         | C-GFFLRIHDPGRWDGV | R             | EKSDPHIKLQLQAE           | ERG          | VVSIKGVCANRYLAMKEDC | R       | LLASKCVTDEC |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 3 | LGCAPRRRL  | Y | C  | AT         | K--YHLQLHPSGRWNGS | L             | ENSAYS                   | I-LEITAVEVGI | VAIRGLFSCRYLAMNKR   | R       | LYASKHYSABC |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 4 | LLGKRLRRL  | Y | C  | NV         | GIGFHLQALPDGRIGGA | H             | ADTRDSL-LELSPVER         | GVVSI        | FCVSRFFVAMSSK       | K       | LYGSPFFTDEC |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 5 | WSLGARTGSL | Y | C  | RV         | GIGFHLQIYDGRWNGS  | H             | EANMLSW-LEIFAVSQ         | CI           | VGIRGVFSNKFAMSKK    | K       | LHASAKFTDDC |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 6 | LVGIKRQRL  | Y | C  | NV         | GIGFHLQGLPDGRISGT | H             | RENFYSL-LEISTVER         | GVVSL        | FCVRSALFVAMNSK      | R       | LYATPSFQEE  |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 7 | EGGDIRVRL  | F | C  | RT         | QW-Y-LRIDKRCVKGT  | Q             | EMKNYNYMIME              | IRT          | VAVGIVAINQVSEFF     | FLAMNKE | K           | LYAKKICNEDC |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 9 | LKGILRRQL  | Y | C  | RT         | C--FHLEIFPNCTIQCT | R             | KDHSRFGILEF              | ISIAVGLV     | SIRCVDSGLYLGMMNE    | K       | LYGSEKLTQEC |             |   |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
|   |            | S | S  | BBBBBBBBBB | -----             | BB            | TTT                      | T            | T                   | T       | TT          | S           | S |   |      |      |     |      |      |      |      |   |   |   |
| 1 | LFLERLEE   | N | H  | Y          | NT                | YISKRHAKN     | -----                    | WF           | VGL                 | RKN     | G           | S           | C | K | RG-- | P    | R   | THYG | QK   | AILE | L    | P | L |   |
| 2 | FFFERLGS   | N | N  | Y          | NT                | YRSRKYTS      | -----                    | WY           | VAL                 | RRT     | G           | Q           | Y | K | LG-- | S    | K   | TGPG | QK   | AILE | L    | P | M |   |
| 3 | EFVERIHE   | L | G  | Y          | NT                | YASRLYRTVSS   | TPGARRQPSAERL            | WY           | WSV                 | NGK     | G           | R           | P | R | RGK  | T    | R   | RT-- | QK   | SSLF | L    | P | R |   |
| 4 | TFKEILLP   | N | N  | Y          | NA                | YESYKYPG      | -----                    | MF           | IAL                 | SKN     | G           | K           | T | K | KG-- | N    | R   | VSPT | MK   | VTHF | L    | P | R |   |
| 5 | KFRERFQE   | N | S  | Y          | NT                | YASAIHRTKTCRE | -----                    | WY           | VAL                 | NKR     | G           | K           | A | K | RGCS | P    | R   | VKPO | HI   | STHF | L    | P | R |   |
| 6 | KFRETLLP   | N | N  | Y          | NA                | YESDLYQG      | -----                    | TY           | IAL                 | SKY     | G           | R           | V | K | RG-- | S    | K   | VSPI | MT   | VTHF | L    | P | R |   |
| 7 | NFKELILE   | N | H  | Y          | NT                | YASAKWTHNGGE  | -----                    | MF           | VAL                 | NQK     | G           | I           | P | V | RGK  | K    | K-- | QK   | TAHF | L    | P    | M |   |   |
| 9 | VFREQFEE   | N | W  | Y          | NT                | YSSNLYKHVD    | TGRR                     | -----        | YY                  | VAL     | MKD         | G           | T | P | R    | EG-- | T   | R    | TKRH | QK   | FTRF | L | P | R |

**Figura 3.** Alinhamento das estruturas primárias de nove membros da família dos FGFs, identificados pelos números à frente de cada sequência. A coloração em vermelho indica homologia ou similaridade química dos resíduos de vários membros da família em relação ao FGF-1. Consideram-se quimicamente semelhantes os resíduos que sofreram mutações conservativas K/R, D/E, T/S, L/V/I e F/Y. Os prováveis sítios de ligação ao receptor e à heparina no FGF-2 encontram-se identificados pelas letras: **S** (Sítio 1; FGF-2 [Y<sup>24</sup>, R<sup>44</sup>, N<sup>101</sup>, Y<sup>103</sup>, L<sup>140</sup> e M<sup>142</sup>]; Springer et al., 1994), **B** (Sítio 2; FGF-2 [Y<sup>108</sup>, Y<sup>115</sup>]; Baird et al., 1988) e **T** (Sítio de ligação à heparina; FGF-2 [K<sup>28</sup>, N<sup>27</sup>, R<sup>81</sup>, K<sup>119</sup>, R<sup>120</sup>, T<sup>121</sup>, Q<sup>123</sup>, K<sup>125</sup>, K<sup>129</sup>, Q<sup>134</sup> e K<sup>136</sup>]; Thompson et al., 1994).

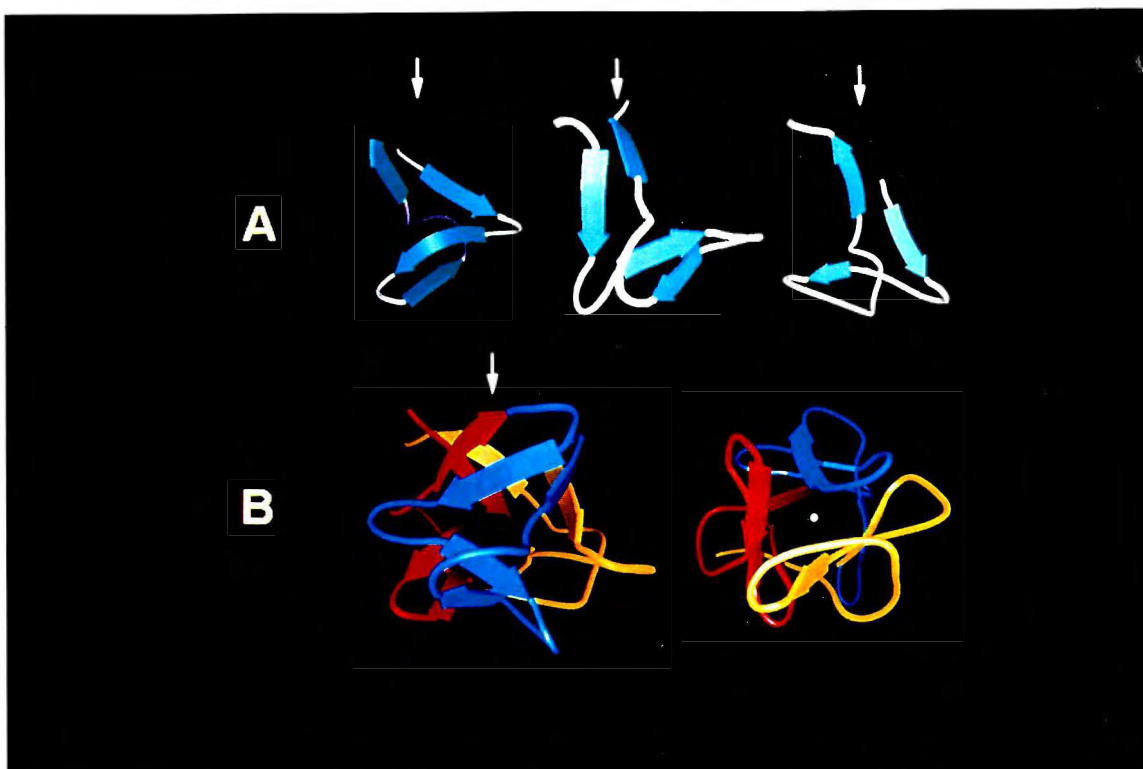
#### 1.4. Estrutura Terciária

Os FGFs 1 e 2, protótipos da família dos FGFs, tiveram suas estruturas cristalográficas determinadas por difração de raios-X (Ago et al., 1991; Eriksson et al., 1991; Zhang et al., 1991; Zhu et al., 1991; Blaber et al., 1995). Estes dados permitiram concluir que as estruturas terciárias das duas proteínas são



praticamente superponíveis, a despeito de apresentarem 45% de diferença quanto à estrutura primária. Os FGFs 1 e 2 são formados por 12 fitas  $\beta$ -pregueadas anti-paralelas organizadas em torno de um eixo de simetria triaxial. Este arranjo, comumente denominado “ $\beta$ -barrel”, ocorre em outras moléculas não relacionadas funcionalmente aos FGFs, tais como as interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e o inibidor do tipo “Kunitz” de tripsina.

Baseados nos dados acima descritos, Murzin e colaboradores (1992) propuseram um modelo, denominado “ $\beta$ -Trefoil fold”, segundo o qual as doze fitas  $\beta$  antiparalelas organizam-se em seis pares de estruturas em folha  $\beta$ . Três folhas  $\beta$ , constituídas por 2 fitas  $\beta$  cada, compõem as paredes do barril e as outras três formam um arranjo triangular que fecha o fundo da estrutura. Alternativamente, o modelo pode ser visualizado como o arranjo de três subunidades similares entre si, formadas por quatro fitas  $\beta$  cada e organizadas em torno de um eixo de simetria triaxial (**Figura 4**).

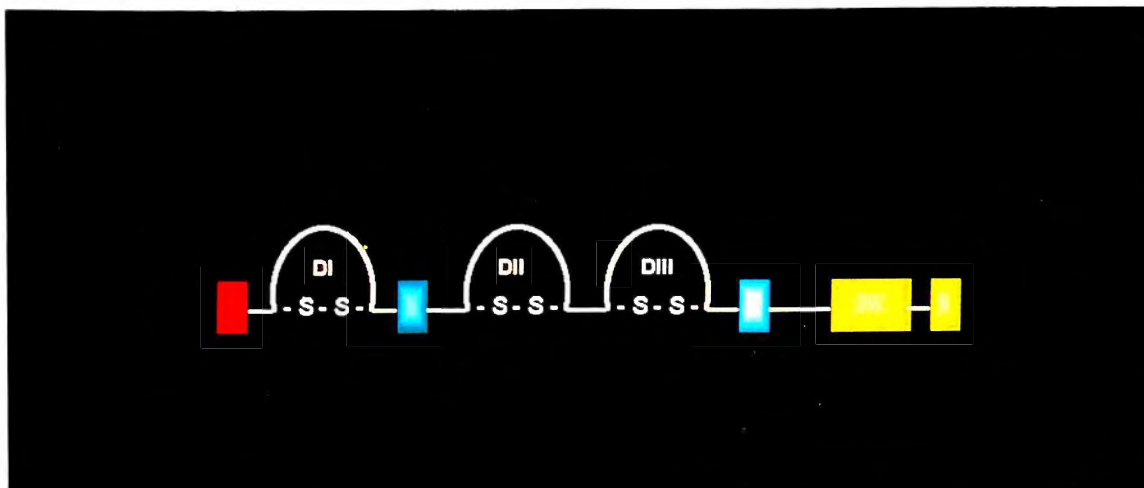


**Figura 4. Estrutura tridimensional do FGF-1 humano a 2,0 Å de resolução (Blaber et al., 1995).** A molécula pode ser desmembrada em três subunidades similares formadas por duas fitas- $\beta$  e um “ $\beta$ -hairpin” cada (**A**). Juntas estas estruturas compõem um barril beta (**B**). As setas indicam o posicionamento do eixo de simetria triaxial.

## 1.5. Domínios Estruturais dos FGFRs

Os FGFRs constituem uma família de glicoproteínas de membrana que possuem atividade de tirosina quinase e alta afinidade pelos FGFs (Burgess & Maciag, 1989; Moscatelli, 1987). Quatro espécies moleculares codificadas por genes diferentes foram descritas até o momento: FGFR-1 ou *fgf* (Lee et al., 1989; Pasquale & Singer, 1989), FGFR-2 ou *bek* (Dionne et al., 1990; Houssaint et al., 1990), FGFR-3 ou *cek2* (Keegan et al., 1991) e FGFR-4 (Partanen et al., 1991). No entanto, o processamento diferencial dos transcritos primários destes quatro genes gera um grande número de variantes estrutural e funcionalmente distintos (Jaye et al., 1992; Johnson & Williams, 1993).

A molécula de FGFR apresenta tipicamente uma sequência líder hidrofóbica em sua porção amino-terminal, à qual se seguem dois ou três domínios extracelulares semelhantes aos encontrados em imunoglobulinas (DI, DII e DIII). Entre os Domínios I e II existe uma sequência rica em resíduos ácidos, denominada “acid box”, cuja função ainda é desconhecida. Após a região extracelular existe uma porção transmembranar, seguida de dois domínios citoplasmáticos de tirosina quinase. Estes dados estruturais foram inferidos a partir das sequências primárias dos FGFRs e revistos por Johnson & Williams, 1993 (**Figura 5**).



**Figura 5. Representação esquemática de um FGFR genérico.** Sequência líder hidrofóbica (em vermelho), “acid box” (verde), domínio transmembranar (azul) e domínios de tirosina quinase (amarelo).

As isoformas  $\alpha$  dos FGFRs 1 - 4 apresentam três domínios extracelulares. Existe um outro processamento que gera as isoformas  $\beta$ , contendo apenas dois domínios "Ig-like". Estes domínios (DII e DIII) são considerados suficientes para a ligação dos FGFs (Wang et al., 1995).

Uma outra classe de isoformas dos FGFRs resulta de um processamento alternativo do mRNA que produz três diferentes sequências para a segunda metade C-terminal do domínio DIII (Johnson & Williams, 1993). A isoforma IIIa constitui uma forma truncada na região transmembranar, resultando em um receptor circulante de função desconhecida. As isoformas IIIb e IIIc geram receptores com diferentes especificidades em relação aos vários membros da família dos FGFs (**Figura 6**).

Heparina interage com os domínios extracelulares do FGFR, protegendo dois fragmentos (30 e 33 KDa) contra degradação por tripsina. Os dados obtidos por Kan e cols. (1993) revelaram que os fragmentos protegidos correspondem a uma região formada pela porção N-terminal do Domínio II, a sequência que conecta os Domínios II e III mais a região N-terminal do Domínio III. O sítio de ligação à heparina (localizado na porção N-terminal do Domínio II) é constituído por um agrupamento de 18 resíduos de aminoácidos bastante conservados em todas as isoformas dos FGFRs. O peptídeo sintético correspondente a esta região ( $^{71}$ KMEKKLHAVPAAKTVKFK $^{88}$ ), denominado K18K, é capaz de se ligar à heparina, ligar-se ao complexo FGF/heparina e inibir a ligação do FGF tanto ao complexo FGFR/heparina em solução como a células intactas (Kan et al., 1993). Esta região é formada por um "cluster" de resíduos básicos de aproximadamente 60 Å. Trata-se, portanto, de uma região apropriada à ligação de heparina, molécula carregada negativamente devido à presença de grupos sulfato e carboxilato.

Além da interação indireta FGF/FGFR mediada por heparina, existe um outro domínio na molécula do receptor que apresenta propriedades de ligação ao FGF (Pantoliano et al., 1994; Springer et al., 1994 e Wang et al., 1995).

Recentemente, dois grupos de pesquisa elucidaram, através de difração de raios-X, as estruturas tridimensionais dos complexos FGF-1/FGFR-2 (Stauber et al., 2000) e FGF-2/FGFR-1 (Plotnikov et al., 1999; Plotnikov et al., 2000).

Estes dados serão analisados detalhadamente no item **Discussão**.

Domínio II

```

FGFR1 IIIc  APYWTSPEK MEKKLHAVPA AKTVKFKCPS SGTPNPTLRW LKNGKEFKPD HRIGGYKVRY
FGFR1 IIIb  .....
FGFR2 IIIc  .....NT.. ...R..... .N...R..A G.N.M..M.. .....QE .....N
FGFR2 IIIb  .....NT.. ...R..... .N...R..A G.N.M..M.. .....QE .....N
FGFR3 IIIc  .....R..R .D...L.... .N..R.R..A A.N.T.SIS. ....R..RGE .....I.L.H
FGFR4 IIIc  .....H.QR ..... GN...R..A A.N.T..I.. ..D.QA.HGE N....IRL.H
    
```

Segmento conectivo

```

FGFR1 IIIc  ATWSIIMDSV VPSDKGNYTC IVENEYGSIN HTYQLDVVER SPHRPILQAG LPANKTVALG
FGFR1 IIIb  .....
FGFR2 IIIc  QH..L..E.. ..... V.....H..... .....ASTVV..
FGFR2 IIIb  QH..L..E.. ..... V.....H..... .....ASTVV..
FGFR3 IIIc  QQ..LV.E.. ....R..... V...KF...R Q..T...L.. .....Q.AV..
FGFR4 IIIc  QH..LV.E.. ....R.T... L...AV...R YN.L...L.. .....T.AVV..
    
```

Domínio III

```

FGFR1 IIIc  SNVEFMCKVY SDPQPHIQWL KHIEVNGSKI GPDNLPLYVQI LKTAGVNTTD KEMEVLHLRN
FGFR1 IIIb  ..... ..HS.I.SS. A.--..T.F.
FGFR2 IIIc  GD...V.... ..A.....I ..V.K....Y ...G...LKV ..A..... ..I...YI..
FGFR2 IIIb  GD...V.... ..A.....I ..V.K....Y ...G...LKV ..HS.I.SSN ..--..A.F.
FGFR3 IIIc  .D...H.... ..A..... ..V.....V ...GT...TV .....A.... ..L...S.H.
FGFR4 IIIc  .D..LL.... ..A..... ..VI...SF .AVGF....V .....DI.SS- -.V...Y...
    
```

Domínio III - Processamento IIIb/IIIc

```

FGFR1 IIIc  VSFEDAGEYT CLAGNSIGLS HHSAWLTVLE
FGFR1 IIIb  .TEAQS...V .KVS.Y..EA NQ.....TR
FGFR2 IIIc  .T..... ..I. F.....P
FGFR2 IIIb  .TEA.....I .KVS.Y..QA NQ.....P
FGFR3 IIIc  .T..... ..F. ....V..P
FGFR4 IIIc  ..A..... ..YQ.....P
    
```

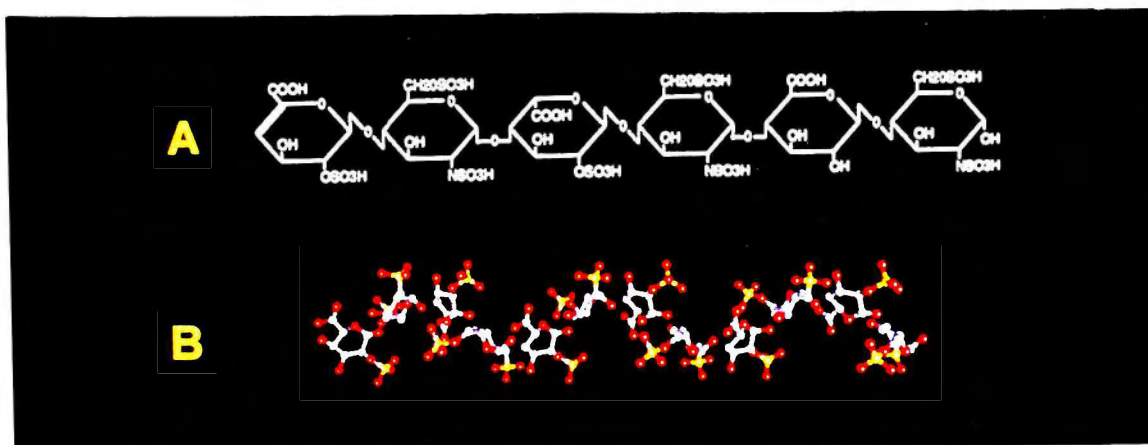
**Figura 6: Alinhamento das sequências disponíveis para as formas humanas dos FGFRs. Os pontos indicam identidade em relação à sequência do FGFR-1β IIIc.**



## 1.6. Heparina e Heparan Sulfato (HS)

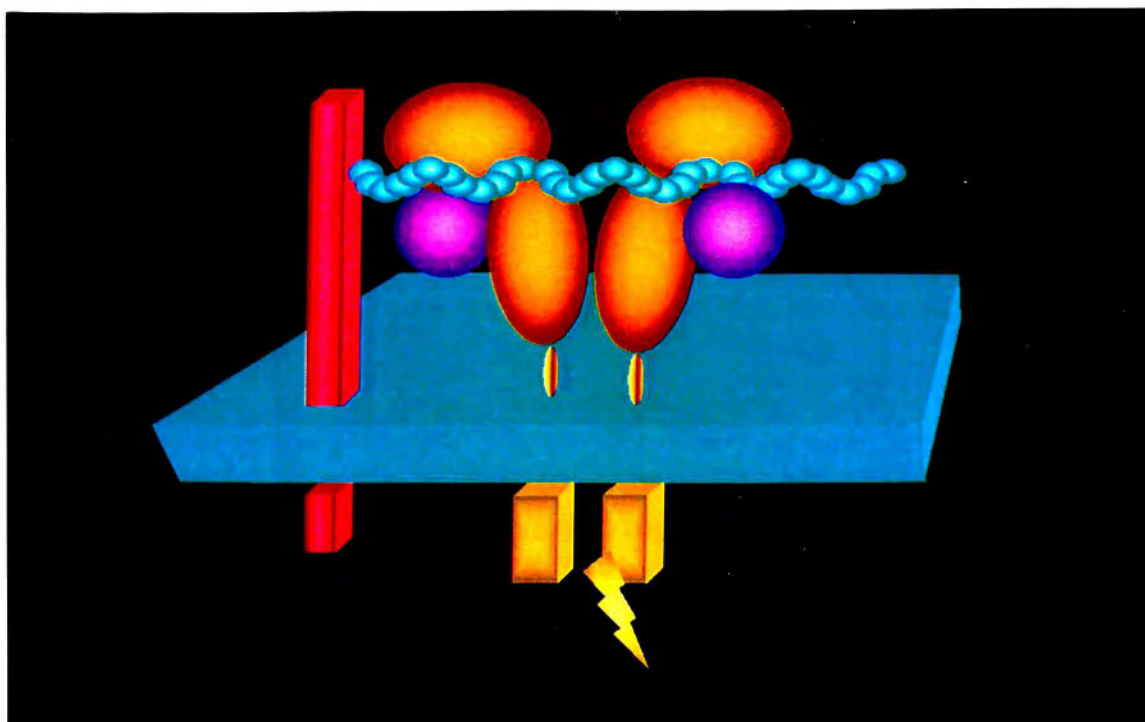
Os membros da família dos FGFs apresentam grande afinidade por heparina (Baird & Klagsbrun, 1991; Miyamoto et al., 1993). Esta propriedade tem sido bastante explorada nos processos de purificação dos FGFs, através de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose (Shing et al., 1984). Estruturalmente semelhante às cadeias polissacarídicas do proteoglicano heparan sulfato, a heparina estabiliza 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 (Gospodarowicz & Cheng, 1986). Além disso, a administração de heparina exógena potencia de forma dramática a atividade mitogênica do FGF-1 sobre fibroblastos em cultura (Moscatelli, 1988). Este fenômeno não é observado no caso do FGF-2.

Tanto heparina como heparan sulfato podem ser fragmentados através de digestão enzimática e química (Silva & Dietrich, 1975; Nader et al., 1990). Estas abordagens levaram à identificação dos requisitos estruturais importantes para as atividades da heparina sobre o FGF-1, tais como tamanho da cadeia polissacarídica e grau de sulfatação (Sudhalter et al., 1989; Gallagher et al., 1992). O hexassacarídeo altamente sulfatado derivado destes glicosaminoglicanos, [IdoUA,2S-GlcNS,6S]<sub>2</sub> - [GlcUA-GlcNS,6S] (Silva & Dietrich, 1975), é capaz de potencializar a atividade mitogênica do FGF-1 e protegê-lo de desnaturação sob extremos de pH, mimetizando assim as atividades da heparina e heparan sulfato (Gambarini et al., 1993; **Figura 7**).



**Figura 7: Oligossacarídeo derivado de heparina. A.** Hexassacarídeo octassulfatado correspondente à unidade estrutural repetitiva da cadeia de heparina (Silva & Dietrich, 1975). **B.** Estrutura tridimensional de um hexassacarídeo sintético, obtida através de ressonância nuclear magnética (Mulloy et al., 1993).

Os FGFs também se ligam às cadeias sacarídicas do proteoglicano heparam sulfato (HS), estruturalmente semelhantes às da heparina (Burgess & Maciag, 1989; Moscatelli, 1987). As moléculas de heparam sulfato encontram-se amplamente distribuídas em vários tecidos, estando presentes na superfície celular e matriz extracelular (Vlodavsky et al., 1987). A importância do heparam sulfato para a ligação dos FGFs aos receptores com atividade de tirosina quinase foi demonstrada através de mutantes da linhagem celular CHO (Chinese Hamster Ovary) deficientes na síntese de glicosaminoglicanos. Estes mutantes foram transfectados com o cDNA codificador para o receptor de alta afinidade, sendo capazes de expressá-lo em grandes quantidades. Apesar disso, as células não apresentavam ligação ao FGF marcado a menos que heparina ou heparam sulfato fossem adicionados exogenamente (Yayon et al., 1991). Tem-se sugerido ainda que os heparans sulfato presentes na superfície celular e na matriz extracelular de diversos tecidos estabilizam a conformação nativa dos FGFs protegendo-os de inativação e proteólise, além de mediar a ligação dos FGFs aos receptores celulares (**Figura 8**; Vlodavsky et al., 1991; Nugent & Iozzo, 2000).



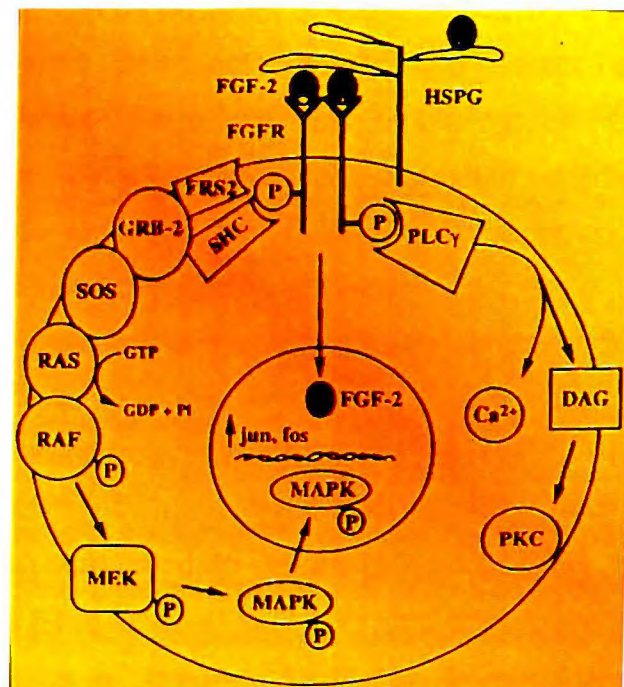
**Figura 8.** Representação esquemática das relações FGF/FGFR/Heparan Sulfato na superfície celular. FGF (roxo); domínios extracelulares do FGFR (laranja); domínios intracelulares com atividade de tirosina quinase (amarelo); heparam sulfato (core proteico – magenta; cadeia polissacarídica – azul claro).



## 1.7. Transdução de Sinal

Sabe-se que a ligação dos FGFs aos receptores resulta na dimerização destes últimos (Bellot et al., 1991; Ueno et al., 1992). Este fenômeno parece constituir um mecanismo geral de resposta a vários hormônios peptídicos, citocinas e fatores de crescimento, tais como: PDGF, EGF, insulina, IGF, hGH (“human Growth Hormone”) e TNF (“Tumor Necrosis Factor”), entre outros (Ullrich & Schlessinger, 1990; Heldin, 1995).

Após a dimerização, ocorre uma autofosforilação cruzada dos domínios de tirosina quinase, resultante da aproximação de ambas as moléculas do receptor. A autofosforilação gera sítios de reconhecimento para proteínas envolvidas no processo de transdução do sinal, tais como PLC- $\gamma$  (fosfolipase- $\gamma$ ), as MAPKs (“Mitogen Activated Protein Kinases”; **Figura 9**).



**Figura 9. Representação esquemática de algumas vias de transdução de sinal ativadas pela ligação do FGF aos receptores celulares e heparan sulfato.** Alguns resíduos de fosfotirosina (P) nos receptores são sítios de ligação para proteínas contendo “src homology domains”, tais como fosfolipase C- $\gamma$  e outros são reconhecidos por proteínas como FRS2 e SHC, que desencadeiam a cascata de ativação até as MAPKs. Estas, por sua vez, são direcionadas ao núcleo onde efetuam o sinal. A ativação de PLC- $\gamma$  resulta na hidrólise de fosfatidil inositol gerando inositol-3-fostato e diacilglicerol (DAG). Neste processo, há a liberação de cálcio e ativação de PKC. Há ainda a possibilidade de uma ação direta do FGF no núcleo (Nugent & Izzo, 2000).

---

## 1.8. Objetivos

Resultados descritos anteriormente (Oyama Jr., S., 1995; Oyama et al., 1996; Kiyota et al., 1999; Kiyota, S., 2000) indicaram ser possível obter compostos de ação efetora ou inibitória sobre a atividade mitogênica dos FGFs através do desenho racional de estruturas peptídicas derivadas destas proteínas e de seus receptores.

Estes estudos demonstraram que peptídeos lineares derivados da sequência primária do FGF-1 eram capazes de estimular a proliferação de fibroblastos em cultura (Oyama et al., 1996). Posteriormente, estudos mais detalhados de modelagem molecular permitiram o desenho de compostos de conformação restrita capazes de mimetizar a atividade mitogênica do hFGF-1 (Kyota et al., 2000).

Tendo em vista o amplo espectro de ações dos FGFs, tanto em nível fisiológico como patológico, torna-se desejável o desenvolvimento de agonistas ou antagonistas peptídicos de suas atividades. O uso de peptídeos sintéticos consiste ainda em uma importante ferramenta de pesquisa para a obtenção de informações estruturais e funcionais sobre o sistema dos FGFs. Estas poderão ser utilizadas na obtenção de um composto modelo destinado ao desenvolvimento de análogos ou inibidores não peptídicos das funções dos FGFs com potencial de aplicação terapêutica.

O presente trabalho teve como objetivo central o desenho racional de peptídeos mitogênicos e de inibidores da atividade mitogênica do hFGF-1. O mesmo foi desenvolvido através das seguintes etapas:

### I. Inibidores:

- a) Proposição de um modelo tridimensional teórico para os domínios extracelulares do FGFR-1 $\beta$ .
- b) Desenho, Síntese e Atividade Biológica de peptídeos relacionados ao FGFR-1 $\beta$ .

### II. Peptídeos mitogênicos:

- a) Análise da estrutura tridimensional do hFGF-1
- b) Desenho, Síntese e Atividade Biológica de peptídeos relacionados ao hFGF-1.



---

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Modelagem Molecular

Os estudos de modelagem molecular foram realizados em uma estação de trabalho IBM-RS6000 (3AT) utilizando os módulos BIOPOLYMER, HOMOLOGU e DOCKING do programa INSIGHT II (Biosym/Molecular Simulation Inc., San Diego, CA). Os cálculos de dinâmica molecular e minimização de energia foram realizados em vácuo através do módulo DISCOVER de INSIGHT II, usando o campo de força "Consistent Valence Force Field" (CVFF) e uma constante dielétrica de 80. Os procedimentos utilizados serão detalhados no item **Resultados e Discussão**.

---

### 2.2. Síntese de Peptídeos

A metodologia empregada foi a síntese em fase sólida, concebida por Merrifield (1963; **Figura 10**). Os peptídeos foram sintetizados manualmente através da estratégia t-Boc (Stewart & Young, 1984) segundo protocolo descrito por Varanda & Miranda em 1997). O suporte polimérico empregado foi a p-metilbenzidrilamino (MBHA) de grau de substituição 0,69 mmol/g. A escala de síntese variou de 0,1 a 0,3 mmol.

#### 2.2.1. Acoplamento

O reagente utilizado para acoplamento dos t-Boc-L-aminoácidos (2,5 vezes de excesso molar) ao suporte polimérico foi a diisopropilcarbodiimida (DIPCDI; 1M) em diclorometano (DCM) ou em diclorometano/n-metilpirrolidona (DCM/NMP; 1:1, v/v) por 1h. O derivado t-Boc-L-asparagina foi acoplado em presença de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) em NMP (quantidades equimolares ao componente carboxílico).

Sempre que necessário, os derivados de aminoácidos foram reacoplados (ou procedeu-se à acetilação do grupo amino terminal residual com anidrido acético).

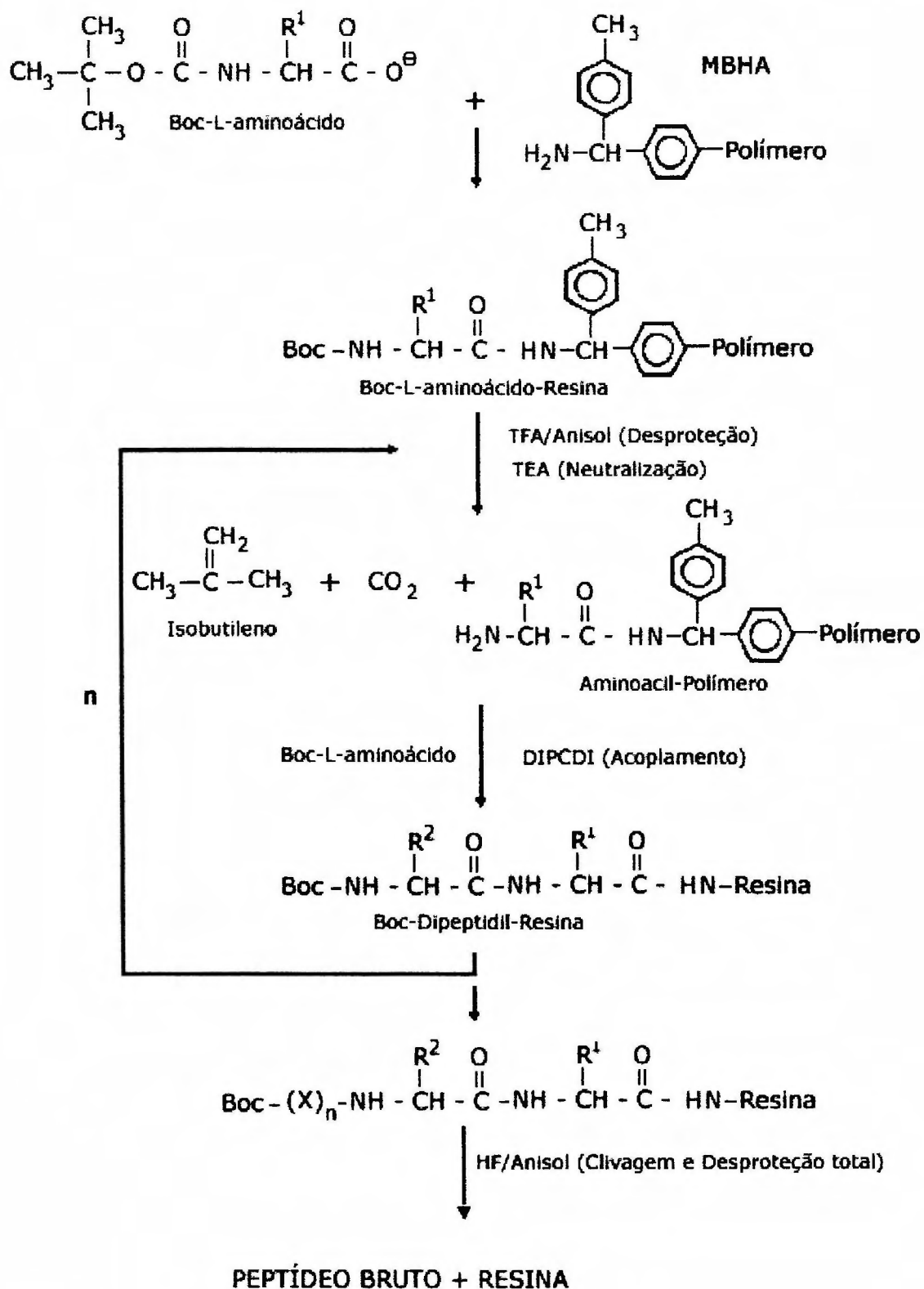


Figura 10. Etapas da síntese em fase sólida; X = resíduo de aminoácido; n = número de resíduos de aminoácidos a serem incorporados.

### **2.2.2. Desproteção e neutralização**

As desproteções dos t-Boc-L-aminoácidos foram realizadas em mistura ácido trifluoroacético (TFA)/DCM (1:1, v/v) contendo anisol (3 a 5%) por 20 min. Após esta etapa, o aminoacil- ou peptidil-resina foi neutralizado através de sua lavagem com solução 10% de trietilamina (TEA) em DCM.

### **2.2.3. Monitoramento**

Acoplamentos, reacoplamentos e desproteções foram continuamente monitorados através de testes de ninidrina (Kaiser et al., 1970).

### **2.2.4. Clivagem do peptídeo-resina**

Os peptídeos brutos foram clivados do suporte polimérico e tiveram suas cadeias laterais desprotegidas através de tratamento a 0°C por 1,5 h com fluoreto de hidrogênio (HF) contendo 3% de anisol (10 ml de HF / 200 a 300 mg de peptidil-resina). Após remoção total do HF e anisol, os peptídeos brutos foram precipitados com éter etílico anidro, lavados e extraídos com os solventes A (TFA 0,1% em água) e/ou B (60% acetonitrila (ACN)/água contendo TFA 0,09%).

---

## **2.3. Purificação**

As soluções provenientes das extrações citadas acima foram liofilizadas e os peptídeos brutos resultantes foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) em um equipamento LDC Analytical, usando uma coluna analítica Nova-Pak C<sub>18</sub> (Waters; 4 $\mu$ ; 0,4 x 15 cm). A avaliação do perfil cromatográfico dos peptídeos brutos foi feita através de um gradiente linear de 5 a 95% de solvente B em 30 min, em fluxo de 1,0 ml/min e  $\lambda$  de 210 nm. Os produtos correspondentes aos picos proeminentes foram coletados e tiveram sua composição de aminoácidos determinada para identificação do peptídeo de interesse.

Os peptídeos foram purificados em escala semi-preparativa em um cromatógrafo Beckman System Gold. Resumidamente, cinquenta a oitenta

miligramas de peptídeo bruto foram dissolvidos em solvente A e aplicados em uma coluna C<sub>18</sub> semi-preparativa (Vydac; 5 $\mu$ ; 300 Å; 2,2 x 25 cm), pré-equilibrada em uma condição inicial isocrática (variável para cada peptídeo). O fluxo foi mantido em 10 ml/min durante todo o processo de purificação. Dez minutos após a aplicação, foi dado início ao gradiente linear desenhado de acordo com as polaridades dos peptídeos e seus tempos de retenção na coluna analítica correspondente. De modo geral, o solvente B utilizado nestes gradientes continha 0,09% de TFA em 60 a 80% ACN/água. Quando necessário, gradientes lineares de TEAP ("triethylammonium phosphate buffer", pH = 2,25 em 60 - 80% ACN/água) foram usados antes de TFA. Os perfis de eluição foram obtidos a 210 nm e os peptídeos de interesse coletados manualmente em diversas frações. Estas foram submetidas a análise por RP-HPLC em condição isocrática previamente determinada. Os graus de pureza dos peptídeos nelas contidos foram utilizados como critério para agrupar as frações. Estas foram posteriormente reunidas e liofilizadas.

---

## **2.4. Caracterização Química dos peptídeos purificados**

### **2.4.1. Estimativa do grau de pureza**

Os peptídeos purificados foram submetidos à análise por RP-HPLC em um equipamento LDC Analytical, usando uma coluna analítica Nova-Pak C<sub>18</sub> (Waters; 4 $\mu$ ; 0,4 x 15 cm). Com base nos tempos de retenção obtidos em gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min (variação de 3% B por minuto), foram desenhados gradientes mais lentos (1% B por minuto), adequados a cada peptídeo, que possibilitaram uma melhor avaliação de seu grau de pureza. As áreas correspondentes aos picos obtidos foram determinadas em integrador.

### **2.4.2. Análise de aminoácidos**

Os peptídeos foram submetidos à hidrólise ácida gasosa, segundo metodologia descrita por Moore & Stein, 1954. Resumidamente, 5 nmol de cada um dos peptídeos foram hidrolisados em presença de HCl 6N e fenol a 110° C por

24h. Após a hidrólise, o material foi diluído em tampão de amostra e submetido à determinação de seu conteúdo de aminoácidos em um analisador automático modelo 7300 da Beckman Instruments, Inc.. O sistema, originalmente concebido por Spackman et al., 1958, realiza a separação dos diferentes aminoácidos através de cromatografia de troca iônica, em resina de poliestireno sulfonado. A eluição ocorre através do aumento gradativo no pH e força iônica dos diferentes tampões. O processo de derivatização pós-coluna, realizado através da reação dos aminoácidos com ninhidrina, permite a detecção dos produtos a 440 ou 570 nm.

#### **2.4.3. Espectrometria de massa**

Os peptídeos purificados foram submetidos à análise por espectrometria de massa segundo a metodologia "Fast Atom Bombardment - Mass Spectrometry" (FAB-MS), gentilmente realizada no laboratório do Dr. Kouki Kitagawa, Niigata College of Pharmacy, Niigata, Japão.

---

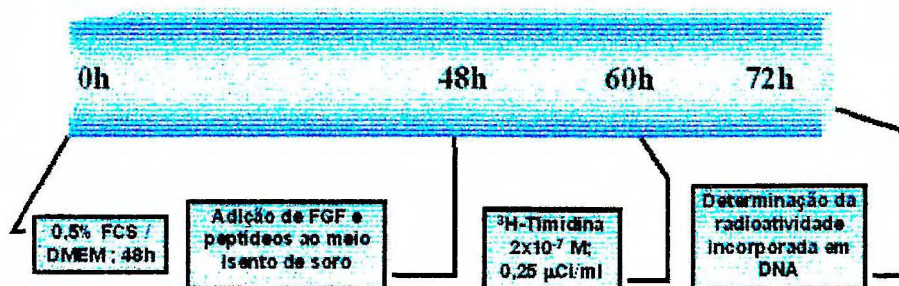
## **2.5. Ensaio Mitogênico**

O protocolo para medida da reestimulação da síntese de DNA segue basicamente aquele descrito por Armelin (1973) acrescido de pequenas modificações (Oyama et al., 1996). Fibroblastos de camundongo Balb/c 3T3 clone A31 foram semeados em placas de 24 poços ( $\varnothing$  15mm, Corning), em 10% de soro fetal bovino (FCS)/Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), e seu crescimento foi monitorado até que atingissem a subconfluência. Neste momento, o meio foi substituído por 1,0 ml de meio contendo 0,5% FCS/DMEM. O carenciamento nestas condições foi efetuado por 48 horas, período suficiente para que a síntese de DNA decaísse a um nível basal de aproximadamente 1% daquele encontrado em 10% FCS. Ao final deste período, o meio de carenciamento foi retirado, os poços foram lavados com DMEM e preenchidos com 0,5 ml do meio de incubação (composto por DMEM contendo 1,0 mg/ml de albumina de ovo).



A este meio, isento de soro, foram adicionados os diversos fatores em diferentes concentrações e combinações. Observou-se que, em ausência de soro, um grande número de células começava a perder a adesão e, ao fim de doze horas, poucas ainda estavam aderidas à placa. A adição de insulina (5  $\mu\text{g/ml}$ ) ao meio isento de soro evita este processo, fazendo com que as células se mantivessem aderidas e viáveis até o fim do período de incubação. Doze horas após a adição dos fatores, foram adicionados 10  $\mu\text{l}$  de [metil- $^3\text{H}$ ]-timidina ( $2 \times 10^{-7}$  M e 0,25  $\mu\text{Ci/ml}$ , concentração final). A coleta das células para a medida da incorporação de  $^3\text{H}$ -Timidina em DNA foi feita 12 h após a adição do isótopo. Para isso, as células foram fixadas com 5% de ácido tricloroacético (TCA) e a seguir solubilizadas em NaOH 0,5N. Essa solução foi absorvida por filtros de papel (1,0 x 1,5cm) que posteriormente foram lavados com TCA 5%, etanol, acetona e por fim secos a 50°C. A seguir, a radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida (Hewlet-Packard). A esquematização do protocolo utilizado é mostrada na **Figura 11**.

Nas condições acima descritas, o máximo de reestimulação da síntese de DNA foi obtida com 10% FCS (100% R). As respostas obtidas com as outras substâncias foram expressas em porcentagens dessa resposta máxima. Os peptídeos foram dissolvidos em uma solução de albumina de ovo 1mg/ml em PBS ("phosphate-buffered saline") e testados na faixa de 1 a 200  $\mu\text{M}$ . FGF-1 humano recombinante (1ng/ml) foi empregado na presença ou ausência de heparina 1  $\mu\text{g/ml}$  como controle interno (em presença de heparina, uma reestimulação da ordem de 60 - 70% é obtida). Todas as experiências foram feitas em duplicatas e repetidas pelo menos três vezes.



**Figura 11. Protocolo para o ensaio de atividade mitogênica.** No tempo zero, células semi-confluentes crescendo exponencialmente foram submetidas a carenciamento em baixo soro (0,5% FCS/DMEM) por 48h. Após este período, as células foram incubadas com os diversos fatores, em meio isento de soro. Doze horas após, [metil- $^3\text{H}$ ]-timidina foi adicionada ao meio e a incubação prosseguiu por mais doze horas. Ao término deste período, as células foram coletadas para contagem do material radioativo incorporado em DNA.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Proposição de um modelo tridimensional teórico para os domínios extracelulares do FGFR-1 $\beta$

Os domínios extracelulares dos FGFRs pertencem a uma família de proteínas estruturalmente relacionadas aos domínios de imunoglobulinas. Estes domínios, denominados “Ig-like”, são compostos por aproximadamente 100 resíduos organizados em 7 a 9 fitas em conformação  $\beta$ -pregueada. O padrão de formação de pontes de hidrogênio entre as fitas define duas folhas  $\beta$  antiparalelas justapostas uma à outra. As diferenças no número, tamanho e posição relativa das fitas  $\beta$  permitem a classificação dos domínios “Ig-like” em subgrupos estruturais chamados “sets” (**Figura 12**; Williams & Barclay, 1988). Os primeiros sets identificados foram os C1, C2 e V, definidos a partir das características dos domínios constantes e variáveis das imunoglobulinas. Recentemente, foi proposto um novo set (“I set”) que combina características estruturais comuns aos sets C e V (Harpaz & Chothia, 1994).

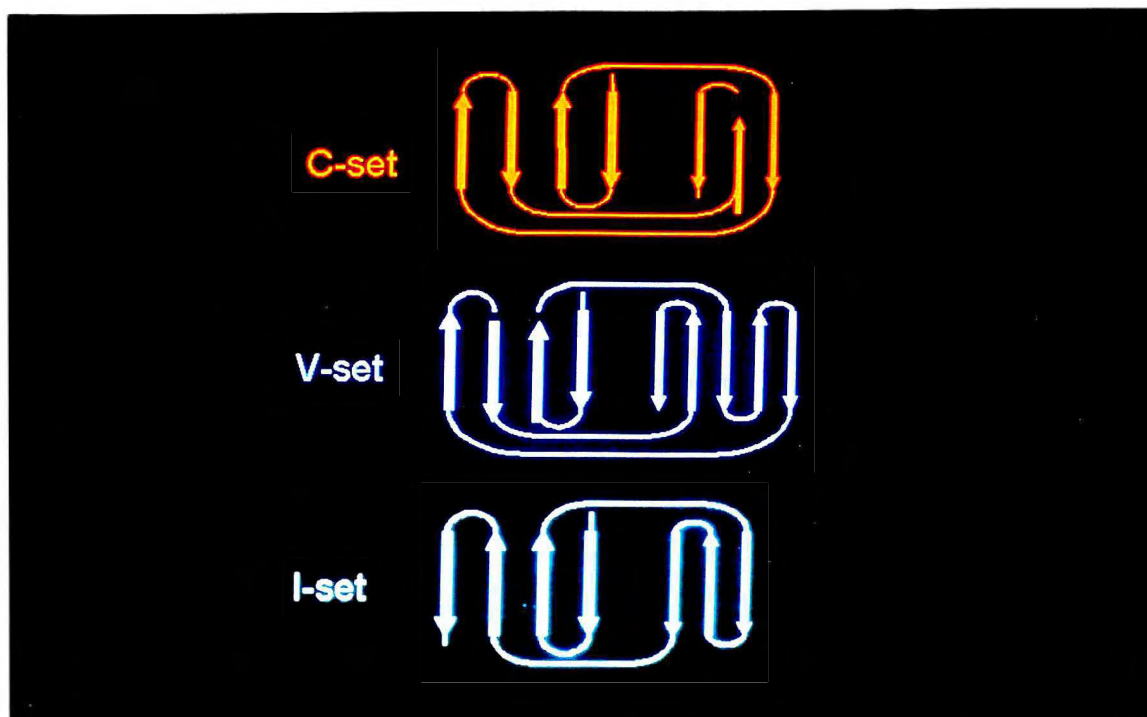
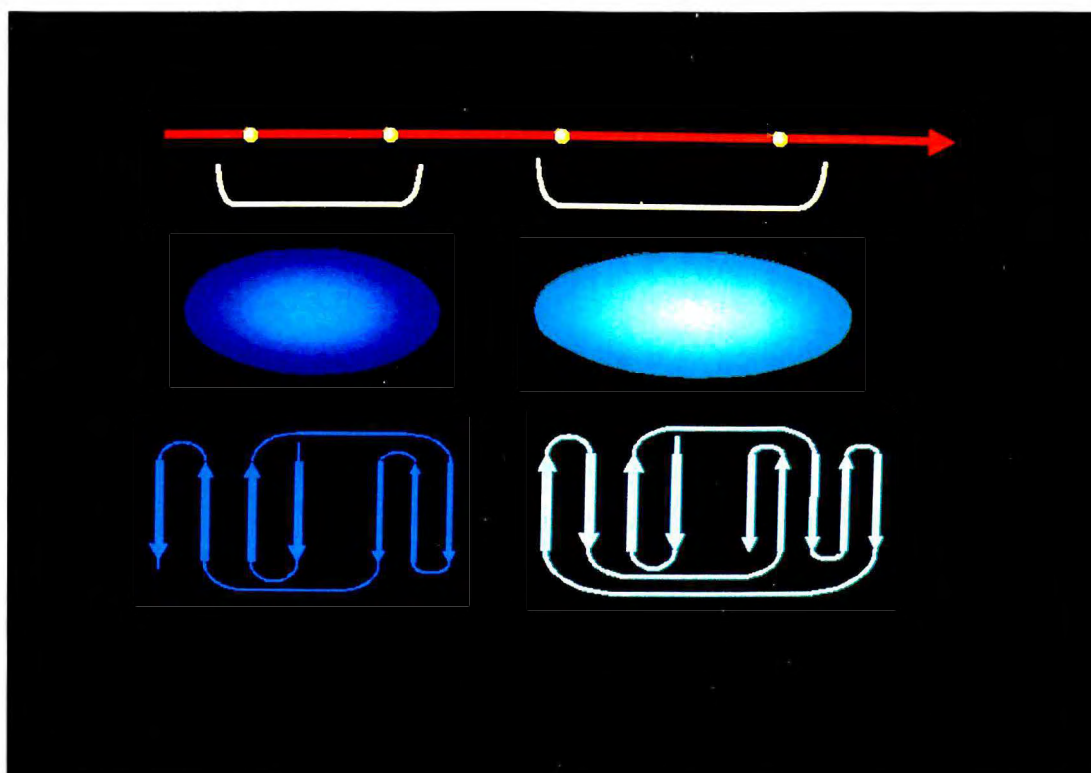


Figura 12. Representação esquemática dos principais motivos estruturais encontrados em moléculas “Ig-like” .

A isoforma  $\beta$  do FGFR-1 possui apenas dois domínios extracelulares (DII e DIII). Há vários indícios descritos na literatura de que estes domínios contenham os sítios para a ligação do FGF e da heparina.

Para a construção do nosso modelo, procuramos na sequência primária de DII e DIII características que indicassem a qual dos subsets "Ig-like" estes domínios pertenceriam. O principal critério adotado foi o de analisar as distâncias entre os resíduos de cisteína na estrutura primária dos dois domínios. Embora exista uma grande variabilidade no número de resíduos de cisteínas e no intervalo entre eles para uma série de proteínas da família das imunoglobulinas (Williams & Barclay, 1988), observa-se que o intervalo entre os resíduos que formam pontes de dissulfeto tende a ser menor para os subgrupos C e I (55 a 60 resíduos) em relação ao subgrupo V (60 a 65 resíduos). Não houve, no nosso caso, ambigüidade quanto à identificação dos subgrupos aos quais os domínios DII e DIII pertenceriam (**Figura 13**).



**Figura 13. Diagrama do processo de construção do modelo tridimensional por homologia.** A seta em vermelho representa a sequência primária dos domínios extracelulares do receptor. As esferas amarelas indicam o posicionamento dos resíduos de cisteína. Em azul, os subsets estruturais atribuídos ao respectivo segmento do receptor.



---

### 3.1.1 Alinhamento do domínio DII

A análise das distâncias entre cisteínas na estrutura primária foi suficiente para indicar que o domínio DII do FGFR-1 $\beta$  poderia pertencer aos subgrupos C ou I. Em seguida, realizamos vários alinhamentos de DII com as sequências de estruturas cristalográficas de representantes dos subgrupos selecionados depositadas em PDB (“Protein Data Bank”). Esta segunda etapa nos levou à escolha da teloquina, domínio C-terminal da proteína “myosin light chain kinase” (código PDB: 1tlk; Holden et al., 1992) como estrutura de referência para a construção do domínio DII. A teloquina pertence ao subgrupo I recentemente proposto por Harpaz e Chothia (1994), similar ao clássico subgrupo V encontrado nos domínios variáveis das imunoglobulinas. A principal diferença entre ambos é a ausência da fita  $\beta$  C” e a presença de uma fita C’ mais curta no subgrupo I. Como consequência, as distâncias entre as cisteínas tornam-se mais curtas em relação àquelas encontradas nos membros do subgrupo V e similares às encontradas no subgrupo C. Apesar destas diferenças, os autores propuseram um conjunto de 18 resíduos-chave conservados em todos os membros dos subgrupos I e V, e que seriam responsáveis pela manutenção de suas estruturas terciárias. Estes resíduos foram selecionados por (i) estarem envolvidos na formação do “core” hidrofóbico da proteína; (ii) estarem envolvidos na formação de pontes de hidrogênio que estabilizam tanto a estrutura secundária como as cadeias laterais de resíduos polares inacessíveis ao solvente no interior da proteína; e (iii) assumirem ângulos de torção com valores incomuns em determinadas regiões da molécula.

Como pode ser visto no alinhamento das sequências do domínio DII com a teloquina, as distâncias entre as cisteínas são bastante similares, diferindo em apenas um resíduo (**Figura 14A**). Apesar da baixa homologia entre as sequências (25%), aproximadamente 70% dos resíduos-chave determinados por Harpaz & Chothia (1994) encontram-se conservados (**Figura 14A**).

---

### 3.1.2. Alinhamento do domínio DIII

Tendo em vista os bons resultados produzidos pelo alinhamento do domínio DII com a teloquina, procedemos à mesma abordagem com relação ao domínio DIII. Da mesma forma, a homologia entre as duas sequências é de cerca de 25% e os resíduos-chave encontram-se conservados (aproximadamente 80%; **Figura 14B**). No entanto, a distância entre os resíduos de cisteína na estrutura primária do domínio DIII é maior (63 resíduos) do que a existente na sequência da teloquina (51 resíduos), gerando uma inserção de 14 resíduos durante o alinhamento. Neste contexto, postulamos que estes resíduos adicionais entre as fitas  $\beta$  C e D na estrutura tridimensional da teloquina poderiam ser acomodados em uma fita  $\beta$  C' mais longa conectada a uma fita  $\beta$  extra (C"). A estrutura resultante seria relacionada àquela encontrada nos membros do subgrupo V.

A análise das sequências de diversas proteínas desta subfamília levou-nos ao domínio variável ( $V_L$ ) da imunoglobulina Bence-Jones (código PDB: 1REI; Epp et al., 1975). Como pode ser visto no alinhamento apresentado na **Figura 14B**, a escolha desta estrutura de referência apresenta a dupla vantagem de possuir uma distância entre cisteínas compatível com a existente na sequência de DIII. Além disso, assim como a teloquina, apresenta mais de 80% dos resíduos-chave conservados.

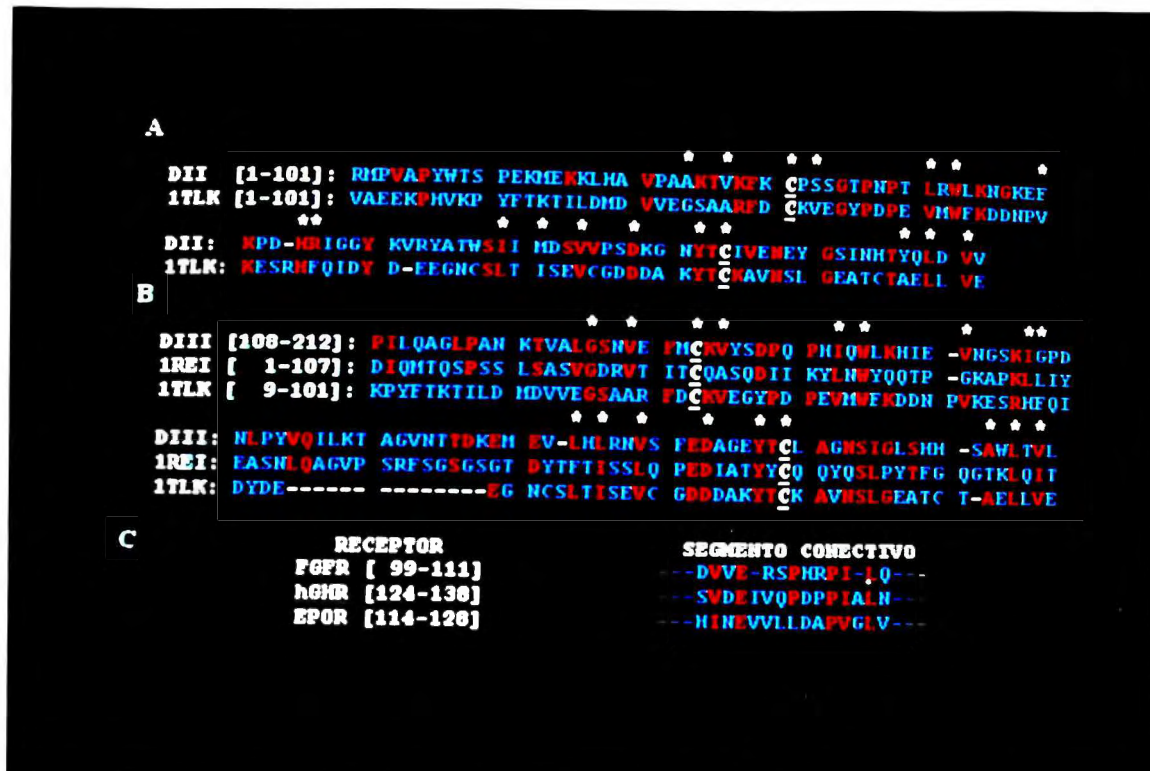


Figura 14. A. Alinhamento das seqüências do domínio DII com a teloquina. B. Alinhamentos de DIII com a teloquina e o domínio variável ( $V_L$ ) da imunoglobulina Bence-Jones. C. Alinhamento dos segmentos conectivos entre os domínios extracelulares do “Fibroblast Growth Factor Receptor” (FGFR), “Human Growth Hormone Receptor” (HGHR) e “Erythropoietin Receptor” (EPOR). Os resíduos marcados em vermelho representam homologia entre as seqüências de referência e a seqüência do FGFR-1. As inserções são representadas por traços na seqüência (-). As mutações K/R; D/E; L/I/V e T/S foram consideradas conservativas e também estão marcadas. Os asteriscos acima das seqüências indicam os resíduos-chave para a manutenção da estrutura das proteínas pertencentes ao subgrupo I (Harpaz & Chothia, 1994).

---

### 3.1.3. Segmento conectivo

Os modelos para os domínios DII e DIII do FGFR-1 $\beta$  foram separadamente refinados através de uma combinação de cálculos de minimização de energia e dinâmica molecular. Em seguida, os dois domínios foram unidos pelo segmento conectivo e a molécula resultante foi novamente refinada empregando os métodos acima.

A análise da estrutura cristalográfica dos domínios extracelulares do receptor do hormônio de crescimento humano (HGHR; de Vos et al., 1992) revela que, assim como para os FGFRs, existe um padrão de enovelamento similar ao das imunoglobulinas. No entanto, a composição de aminoácidos da última fita  $\beta$  do primeiro domínio do HGHR e do segmento conectivo que a precede confere um padrão estrutural único à esta região. O segmento conectivo é constituído por quatro resíduos (VDEI; **Figura 14C**) que apresentam valores  $\phi$  e  $\psi$  bastante incomuns em relação aos frequentemente encontrados em regiões análogas nas imunoglobulinas. Estes ângulos geram uma estrutura helicoidal para o segmento conectivo que quebra o padrão de fitas  $\beta$  dominante nos domínios “Ig-like” do HGHR. Seguido a ele, está uma sequência “PDPP” que termina a estrutura em hélice e volta ao padrão de fita  $\beta$ . Pressupõe-se que o conjunto destas características nesta região do HGHR seja responsável pela disposição espacial dos domínios extracelulares (de Vos et al., 1992).

Recentemente, a estrutura tridimensional para os domínios extracelulares do receptor da eritropoietina foi determinada (EPOR; Livnah et al., 1996). Estes domínios “Ig-like” também apresentam semelhanças estruturais com os do HGHR. Apesar de pertencerem a diferentes subgrupos dentro da família das imunoglobulinas, a orientação relativa dos mesmos é bastante similar. É possível observar que existe uma grande conservação tanto estrutural quanto de composição de aminoácidos no segmento que conecta os dois domínios destas moléculas (**Figura 14C**).

As observações acima nos levaram a comparar a sequência do segmento conectivo no nosso modelo para o FGFR com as sequências equivalentes nos receptores HGHR e EPOR. Embora houvesse baixa

homologia de sequência primária nos dois domínios "Ig-like" do FGFR em relação a HGHR e EPOR, procuramos alinhar apenas a última fita  $\beta$  do primeiro domínio, o segmento conectivo e a primeira fita  $\beta$  do segundo domínio nas três moléculas. Como podemos observar no alinhamento da **Figura 14C**, existe uma correspondência entre as sequências. Além da conservação dos resíduos Val / Ile - X - Glu (cuja conformação helicoidal foi experimentalmente determinada para HGHR e EPOR), podemos observar a existência de uma prolina conservada nos três casos analisados. É interessante notar que este resíduo é conservado em todos os receptores de citocina classes 1 e 2, família à qual pertencem HGHR e EPOR, e presume-se que sua presença nesta região determine a conformação incomum observada para estas moléculas (de Vos et al., 1992; Livnah et al., 1996).

Baseados nestas observações, decidimos realizar a construção por homologia do segmento conectivo do FGFR isolado, atribuindo-lhe as coordenadas do HGHR. Em seguida, respeitando a orientação relativa dos domínios extracelulares encontrada em HGHR, realizamos a conexão do novo segmento aos domínios DII e DIII do FGFR. A molécula resultante foi submetida aos passos de refinamento por minimização de energia e dinâmica molecular anteriormente descritos.

---

#### **3.1.4. Avaliação da estrutura final**

Outros modelos para os domínios extracelulares do FGFR já foram propostos anteriormente. Pantoliano e colaboradores (1994) utilizaram um método que automaticamente produz alinhamento da sequência-alvo com várias estruturas cristalográficas. Através desta procura automática, os autores chegaram aos domínios  $C_{H2}$  e  $V_H$  de diferentes imunoglobulinas. Estas moléculas foram usadas como estruturas de referência para a construção dos domínios DII e DIII do FGF-1 $\beta$ , respectivamente. O modelo resultante deste alinhamento é bastante diferente do nosso. Em primeiro lugar, a atribuição do sugrupo C2 (ao qual pertence o domínio  $C_{H2}$ ) para o domínio DII resulta em um padrão estrutural bastante distante daquele apresentado pelo nosso modelo,



que se baseia no subgrupo I. Além disso, as distâncias entre cisteínas na estrutura primária são muito discrepantes, o que resulta em várias inserções e, conseqüentemente, em regiões de estrutura indefinida. O mesmo pode ser observado para a atribuição de coordenadas do domínio DIII. Apesar de, assim como no nosso caso, os autores utilizarem uma estrutura de referência do subgrupo V, o número de inserções e deleções é muito alto, resultado de uma grande diferença na distância entre as cisteínas.

Durante a fase de refinamento do nosso modelo, Bateman & Chothia (1995) descreveram "outline structures" para os domínios DI, DII e DIII dos FGFRs. Os autores basearam-se em seus resultados anteriores (Harpaz & Chothia, 1994) para propor que a conservação dos resíduos-chave na estrutura da teloquina e em diversos membros dos subgrupos I e V seria indicativa de uma similaridade estrutural entre os três domínios extracelulares dos FGFRs e a teloquina. De fato, esta proposição veio a corroborar nossos resultados referentes à construção do modelo tridimensional para o domínio DII do FGFR-1 $\beta$ .

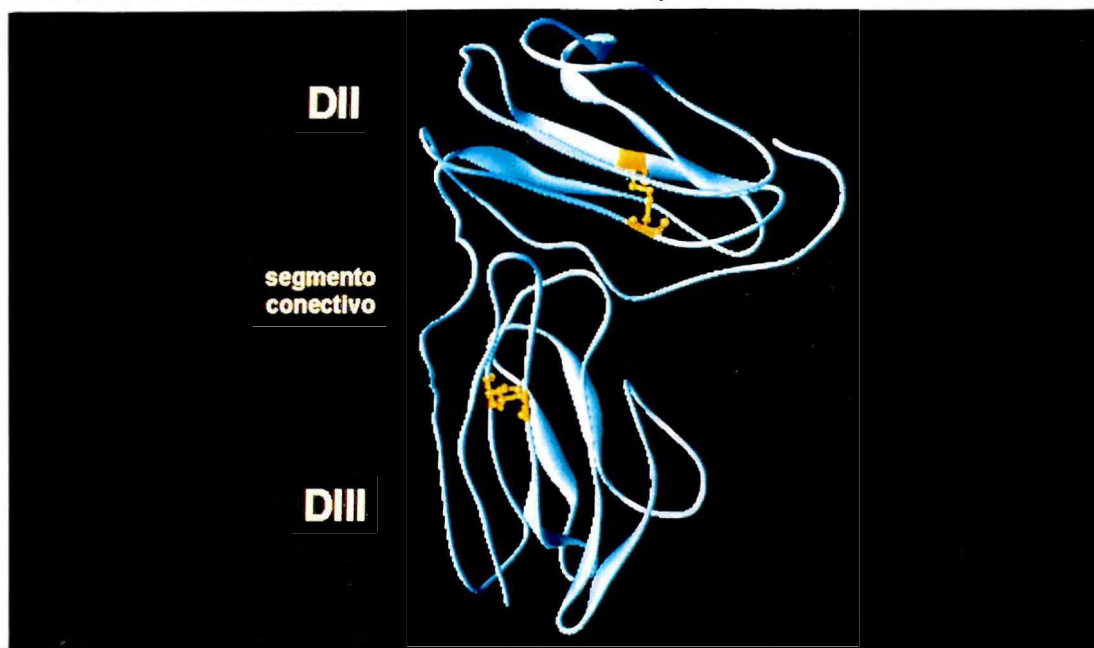
No entanto, com relação ao domínio DIII, nossos dados são bastante diferentes dos descritos por Bateman & Chothia (1995). Como pode ser visto na **Figura 14B**, a distância entre cisteínas em DIII é 14 resíduos maior em relação à existente na sequência da teloquina. Este segmento é grande demais para ser acomodado em uma alça. Além disso, a presença deste segmento adicional resultaria em uma grande perturbação da estrutura terciária da molécula na região de inserção. Contudo, os demais resíduos são satisfatoriamente alinhados e os resíduos-chave são bastante conservados. Resumindo, a estrutura proposta por Bateman & Chothia (1995), baseada na estrutura da teloquina, não é capaz de fornecer coordenadas a este segmento extra e o modelo resultante é pouco confiável.

A atribuição das coordenadas de uma estrutura de referência pertencente a outro subgrupo (V) ao domínio DIII pareceu-nos mais apropriada. Assim como o subgrupo I, o V também é mantido pelos mesmos resíduos-chave (Harpaz & Chothia, 1994). A diferença entre ambos está na distância entre as cisteínas na estrutura primária, o que ocasiona a diminuição de uma fita  $\beta$  (C') e a ausência de outra (C"). Os resíduos pertencentes ao segmento de

DIII, inseridos sem serem acomodados na estrutura da teloquina por Bateman & Chothia (1995), encaixam-se perfeitamente nas fitas  $\beta$  C' e C'' quando usamos as coordenadas do domínio V<sub>L</sub> da imunoglobulina Bence-Jones como estrutura de referência. Neste caso, ambos os requisitos (conservação dos resíduos-chave e da distância entre cisteínas) são satisfeitos pelo nosso modelo.

O modelo final do conjunto DII-segmento conectivo-DIII aqui proposto fornece ainda a posição espacial e orientação relativa das cadeias laterais de cada resíduo em ambos os domínios. Os aminoácidos em uma proteína podem exercer um papel direto na atividade biológica da molécula, através de interações com outros ligantes, ou um papel indireto através da manutenção da estabilidade e geometria dos sítios de ligação. A estrutura final obtida (**Figura 15**; Oyama et al., 1997) permitiu localizar espacialmente vários resíduos do receptor descritos como importantes para a ligação ao FGF e à heparina, tendo sido de extrema utilidade na orientação do desenho de peptídeos que pudessem mimetizar estas propriedades.

Após a conclusão dos nossos estudos, dois grupos de pesquisa conseguiram solucionar a estrutura tridimensional do complexo FGF/ FGFR através de difração de raios X (Plotnikov et al., 1999; Plotnikov et al., 2000; Stauber et al., 2000). As implicações destas descobertas frente aos dados por nós obtidos serão discutidas ao final deste capítulo.



**Figura 15. Modelo tridimensional dos domínios extracelulares do FGFR-1 $\beta$ .**

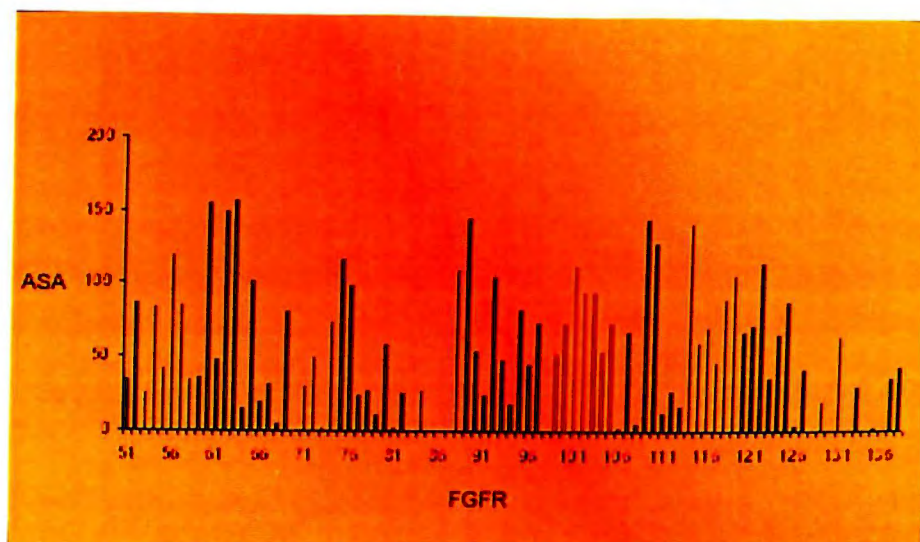
## 3.2. Desenho, Síntese e Atividade Biológica de peptídeos relacionados ao FGFR-1 $\beta$ .

### 3.2.1. Desenho

Estudos descritos na literatura indicam que um segmento contínuo de 139 resíduos do FGFR-1 é o principal determinante para a ligação do FGF-1 ao receptor (Wang et al., 1995). Esta região corresponde à porção C-terminal do domínio DII, o segmento conectivo entre DII e DIII e segmento N-terminal do domínio DIII.

Este segmento foi analisado quanto ao grau de homologia presente em todas as isoformas dos FGFRs (**Figura 6**) e quanto à área acessível ao solvente destes resíduos no modelo teórico do FGFR-1 $\beta$  (**Figura 16**).

O posicionamento espacial deste segmento na estrutura tridimensional do modelo, aliado a estudos de modelagem molecular, permitiu-nos reduzir esta sequência a um core mínimo de 16 resíduos (Y<sup>96</sup> - Q<sup>111</sup>). Os mesmos são bastante conservados em todos os FGFRs e se apresentam expostos ao solvente. Estas características foram consideradas indícios de que este segmento contivesse os elementos importantes para a ligação ao FGF-1. Esperávamos, com isto, propor peptídeos relativamente pequenos que fossem capazes de se ligar ao FGF-1 e inibir sua atividade mitogênica.

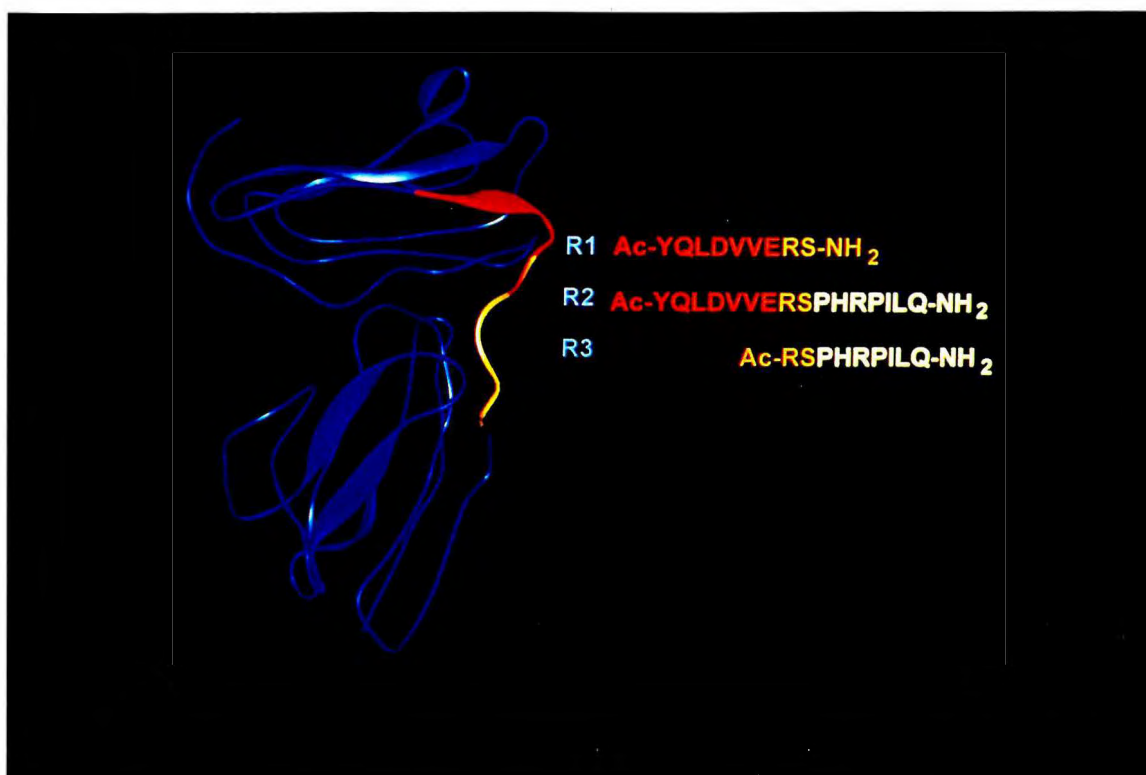


**Figura 16. Medidas de área acessível ao solvente (ASA) dos resíduos pertencentes ao segmento C-terminal do domínio DII, segmento conectivo e N-terminal do domínio DIII, de acordo com sua localização na estrutura tridimensional do modelo teórico do FGFR-1 $\beta$ . Em vermelho, encontram-se destacadas as áreas dos resíduos 99 a 105.**



Com base nestas informações, foram desenhados três peptídeos lineares (R1, R2 e R3) que encobrissem de forma completa este segmento de 16 resíduos. O peptídeo R2 corresponde à sequência completa e os peptídeos R1 e R3 correspondem às porções N e C-terminais do segmento, respectivamente. Com o intuito de anular as cargas dos grupos N e C-terminais de cada peptídeo (inexistentes nos segmentos originais na molécula do receptor) decidimos pela síntese de peptídeos acetilados e amidados.

Os peptídeos desenhados e sua localização na estrutura tridimensional do modelo são apresentados na **Figura 17**.



**Figura 17. Sequências dos peptídeos R1, R2 e R3 (Y<sup>98</sup> - Q<sup>111</sup>) relacionados à estrutura do FGFR-1 $\beta$  e sua localização topológica na estrutura tridimensional do modelo teórico.**

---

### 3.2.2. Síntese, purificação e caracterização de peptídeos

A síntese de R1, R2 e R3 forneceu os resultados descritos na **Tabela 1**.

Os graus de pureza estimados através de RP-HPLC em coluna analítica, em dois sistemas de solventes diferentes, estão apresentados na **Tabela 2**. As condições de análise foram:

R1: gradiente de 15 a 45% de solvente B em 30 min.

R2: gradiente de 30 a 60% de B em 30 min.

R3: gradiente de 20 a 50% de B em 30 min.

Solvente A: 0,1% TFA em água ou TEAP

Solvente B: 0,09% TFA em 60% ACN/água ou 60% ACN/TEAP.

Os perfis cromatográficos obtidos durante o processo de purificação em TFA são apresentados nas **Figuras 18 e 19**. Em ambos os sistemas, o grau de pureza observado para cada peptídeo foi superior a 98 % (**Tabela 2**). Os dados obtidos na sua caracterização por análise de aminoácidos e espectrometria de massa estão mostrados nas **Tabelas 2 e 3**.

**Tabela 1. Rendimentos obtidos para a síntese dos peptídeos R1, R2 e R3.**

| Peptídeo | Massa inicial de resina (MBHA; mg) | Massa final de peptídeo-resina (mg) | Massa submetida à clivagem e desproteção total (mg) | Massa de peptídeo bruto obtido (mg) | Massa de peptídeo purificado (mg) | Rendimento (%) |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| R1       | 320                                | 642                                 | 321   | 206                                 | 45                                | 22             |
| R2       | 320                                | 1.084                               | 700   | 150                                 | 35                                | 23             |
| R3       | 320                                | 680                                 | 680   | 300                                 | 105                               | 35             |

**Tabela 2. Determinação do grau de pureza por RP-HPLC e caracterização dos peptídeos através de espectrometria de massa.**

| Peptídeo | Grau de Pureza (%) | FAB-MS    |           |
|----------|--------------------|-----------|-----------|
|          |                    | Calculado | Observado |
| R1       | > 98               | 1149,1    | 1149,6    |
| R2       | > 98               | 1991,2    | 1991,7    |
| R3       | > 98               | 1144,3    | 1144,8    |

**Tabela 3. Proporções molares obtidas entre os aminoácidos contidos nos diferentes peptídeos, bem como sua relação com os valores esperados\*.**

| R1          | Y    | Q    | L    | D    | V    | E    | R    | S    |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Esp.</b> | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| <b>Obs.</b> | 0,98 | 0,91 | 1,00 | 0,95 | 1,97 | 1,02 | 1,04 | 0,90 |

| R2          | Y    | Q    | L    | D    | V    | E    | R    | S    | P    | H    | I    |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Esp.</b> | 1,00 | 2,00 | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 |
| <b>Obs.</b> | 0,99 | 2,01 | 2,00 | 0,97 | 2,02 | 1,03 | 2,06 | 0,94 | 1,98 | 0,94 | 0,97 |

| R3          | R    | S    | P    | H    | I    | L    | Q    |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Esp.</b> | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 |
| <b>Obs.</b> | 1,97 | 0,92 | 2,03 | 0,97 | 2,01 | 1,00 | 0,94 |

\* Os valores observados para cada aminoácido foram normalizados em relação ao valor da Leucina, aminoácido estável nas condições de hidrólise.



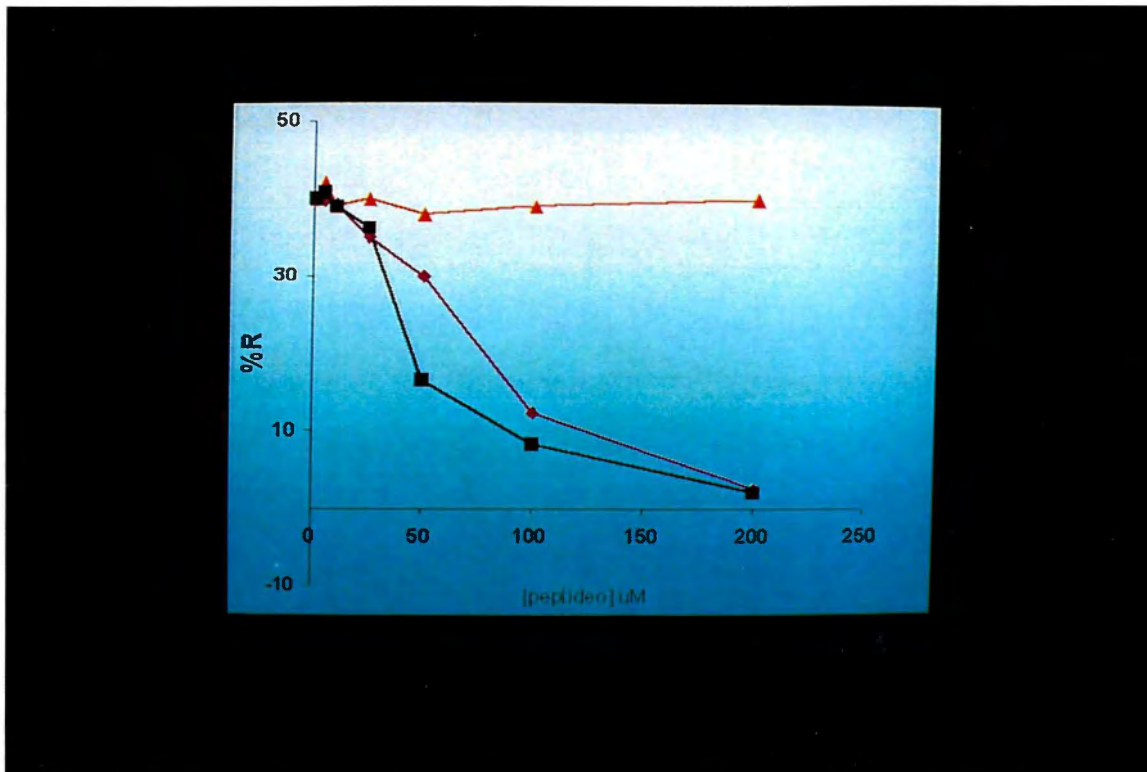
---

### 3.2.3. Atividade Biológica

Os peptídeos R1, R2 e R3 foram testados quanto à sua capacidade de inibir a atividade mitogênica dos FGFs 1 e 2 sobre fibroblastos 3T3 em cultura. Os mesmos foram pré-incubados em diferentes concentrações, em presença e ausência de 50 pM dos FGFs 1 e 2 a 37°C durante 15 min. Após este período, a mistura de fatores (ou os controles contendo os fatores isolados) foi adicionada ao meio de cultura. Com o intuito de evitar que os FGFs aderissem à superfície dos recipientes de incubação, adicionamos ao meio 0,5 mg/ml de albumina bovina dissolvida em tampão fosfato.

Os resultados mostram que, conforme esperado, R1 e R2 foram capazes de inibir a ação do FGF-1 quando testados na faixa de 1 a 200  $\mu$ M (**Figura 20**). Este efeito é seletivo, já que a atividade do FGF-2 não é afetada por nenhum dos peptídeos testados na mesma faixa de concentrações (**Figura 21**). A atividade inibitória é dose-dependente para ambos os peptídeos, e observa-se que a ação de R1 é um pouco superior à de R2. Os dados obtidos revelam ainda que o efeito é sequência-dependente, já que o peptídeo R3, correspondente à porção C-terminal de R2, é inativo na faixa de concentrações testada. Por outro lado, o segmento N-terminal de R2 (representado por R1) é suficiente para desencadear o mesmo nível de inibição apresentado pelo peptídeo R2 inteiro ( $ID_{50} = 40 - 50 \mu$ M; Oyama et al., 1999).





**Figura 20. Atividade inibitória dos peptídeos sintéticos sobre a ação mitogênica do FGF-1.** Diferentes concentrações dos peptídeos R1 (losango), R2 (quadrado) e R3 (triângulo) foram pré-incubadas com 50 pM de FGF-1 por 15' a 37°C e adicionados a fibroblastos 3T3 em cultura. Os níveis de resposta são apresentados como porcentagens (%R) daquela obtida com 10% de soro fetal bovino (100% R).

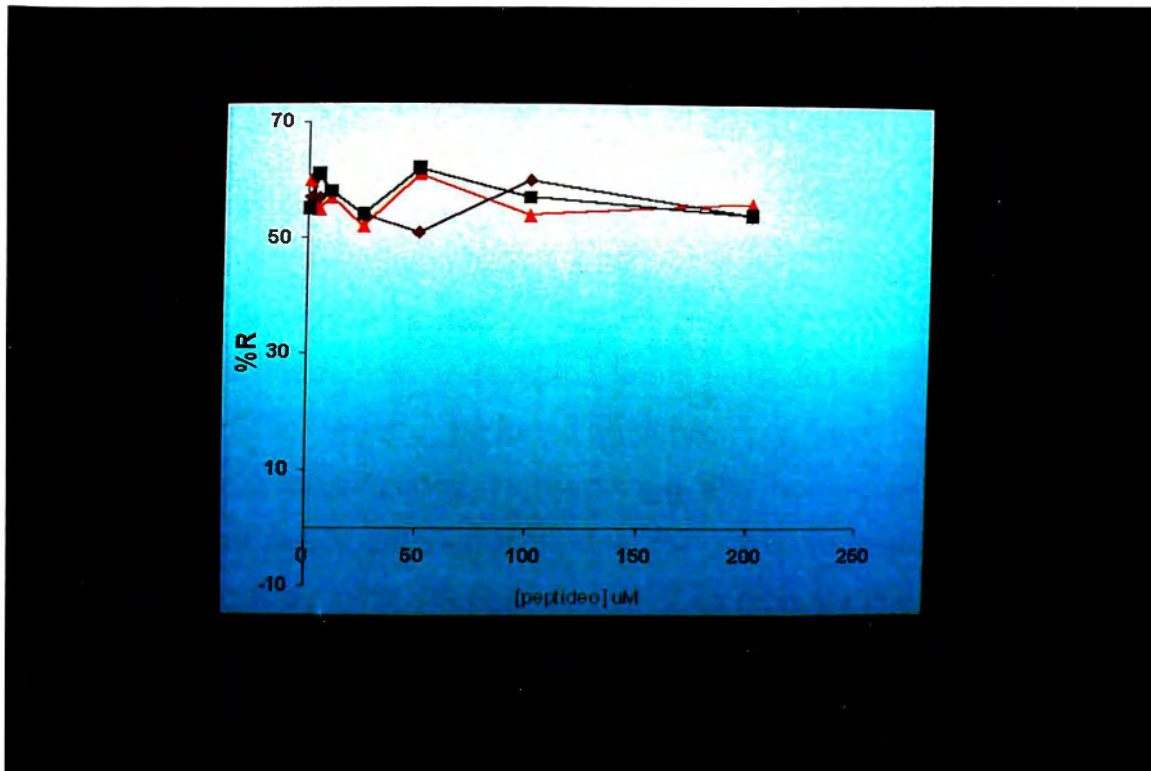


Figura 21. Atividade inibitória dos peptídeos sintéticos sobre a ação mitogênica do FGF-2.

---

### 3.3. Análise da estrutura tridimensional do hFGF-1

#### 3.3.1. Domínios Estruturais dos FGFs

Várias abordagens têm sido utilizadas no estudo da estrutura e função dos FGFs 1 e 2.

Através de peptídeos sintéticos correspondentes a fragmentos do FGF-2, Baird e colaboradores (1988) mapearam dois domínios envolvidos na ligação à heparina e aos receptores celulares. Segundo este estudo, peptídeos derivados da região (FGF-2 [106-115]; **Figura 3**) foram capazes de se ligar à heparina e competir com o FGF-2 pela ligação aos receptores celulares, além de estimular a incorporação de timidina tritiada em fibroblastos 3T3.

Anticorpos monoclonais produzidos contra o FGF-2 humano, capazes de bloquear a ligação deste ao receptor, foram utilizados na análise de um banco de hexapeptídeos gerados de forma randômica por fagos filamentosos. Os dois hexapeptídeos encontrados apresentaram alta homologia com a sequência localizada na região anteriormente descrita por Baird e colaboradores (1988), sendo capazes de inibir a ligação do FGF-2 ao receptor (Yayon et al., 1993).

Mais recentemente, Oyama e colaboradores (1996) e Kiyota e colaboradores (1999) descreveram peptídeos mitogênicos derivados da região correspondente no FGF-1 humano capazes de competir pela ligação da proteína aos receptores celulares.

Anteriormente, em 1994, Springer e cols. identificaram outro sítio de ligação ao receptor na molécula do FGF-2. Este domínio é composto por um agrupamento de aminoácidos expostos ao solvente e bastante conservados em todos os membros da família dos FGFs (FGF-2: Y<sup>24</sup>, R<sup>44</sup>, N<sup>101</sup>, Y<sup>103</sup>, L<sup>140</sup> e M<sup>142</sup>, **Figura 3**). Trata-se de um segmento descontínuo que apresenta uma afinidade pelo receptor cerca de 250 vezes maior em relação ao anteriormente descrito (Sítio 2). Por esta razão, esta região passou a ser designada Sítio 1. A interação deste domínio com o receptor independe da presença de heparina.

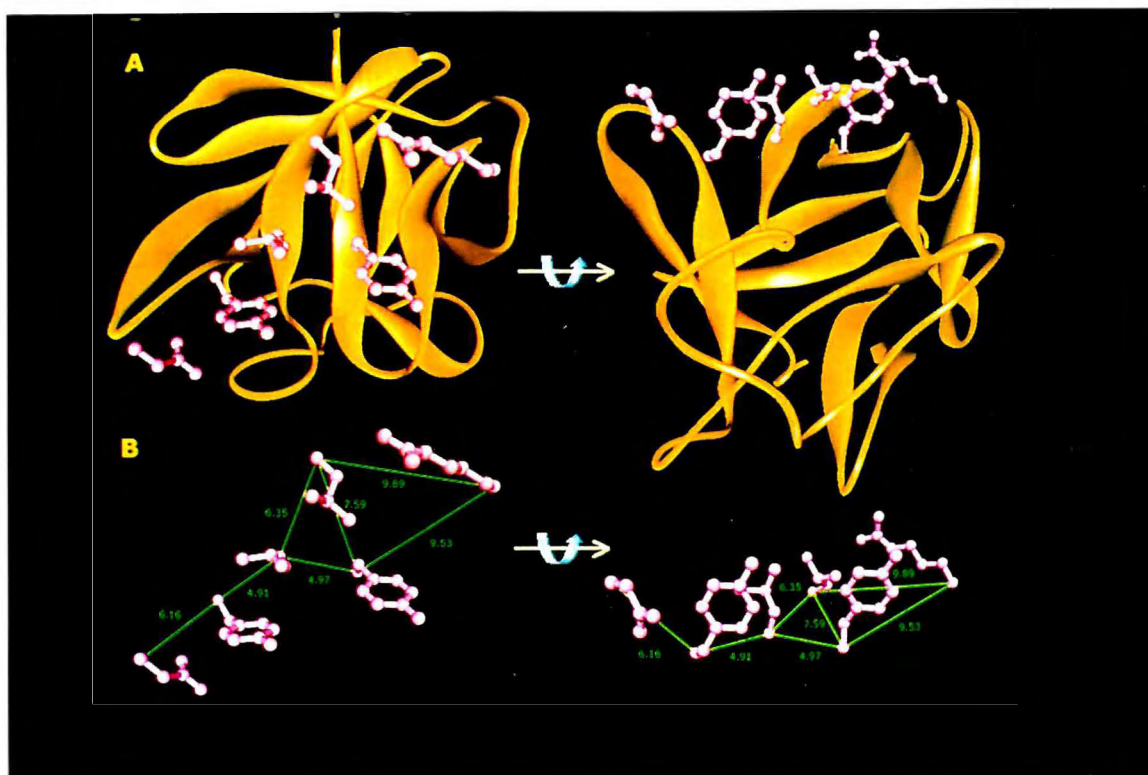
Por fim, tem sido descrito um terceiro domínio nas moléculas dos FGFs 1 e 2, contíguo ou parcialmente sobreposto ao Sítio 2. Trata-se de um sítio de ligação à heparina e heparano sulfato, composto por resíduos básicos e resíduos polares não carregados. A combinação de estudos de mutagênese

sítio-dirigida e titulação microcalorimétrica levou Thompson e cols. (1994) a determinarem a contribuição de cada um dos resíduos desta região no FGF-2 para a energia livre de ligação dos mutantes à heparina. Os dados obtidos permitiram identificar um domínio descontínuo responsável pela ligação do FGF-2 à heparina. Este sítio é formado pelos resíduos K<sup>26</sup>, N<sup>27</sup>, R<sup>81</sup>, K<sup>119</sup>, R<sup>120</sup>, T<sup>121</sup>, Q<sup>123</sup>, K<sup>125</sup>, K<sup>129</sup>, Q<sup>134</sup> e K<sup>135</sup> (**Figura 3**). Estes estudos revelam ainda uma contribuição majoritária de interações de caráter não-iônico (pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals) fornecidas por resíduos sem carga líquida, tais como asparagina e glutamina para a ligação à heparina.

Os estudos acima descritos foram realizados com o FGF-2. Utilizando o alinhamento apresentado na **Figura 3** e sobrepondo as estruturas tridimensionais dos FGFs 1 e 2, mapeamos a localização destes sítios na estrutura cristalográfica do FGF-1 humano (**Figura 22**).

No hFGF-1, o sítio 1 é constituído por: Y<sup>30</sup>, R<sup>50</sup>, N<sup>107</sup>, Y<sup>109</sup>, L<sup>148</sup> e L<sup>150</sup>. Essencialmente, o sítio é composto por um núcleo hidrofóbico formado por Y e L, flanqueado pelos resíduos polares R e N (**Figura 22**).

A partir destas informações, medimos as distâncias entre os carbonos  $\alpha$  dos resíduos participantes deste sítio na estrutura cristalográfica do hFGF-1. Uma vez que não se trata de uma sequência linear, o resultado destas medições nos levou a um desenho tridimensional da distribuição das cadeias laterais. Os carbonos  $\alpha$  dos seis resíduos estão localizados aproximadamente em um mesmo plano, definindo uma superfície à qual encontram-se perpendiculares as cadeias laterais (**Figura 22**).



**Figura 22.** Posicionamento espacial dos resíduos  $Y^{30}$ ,  $R^{50}$ ,  $N^{107}$ ,  $Y^{109}$ ,  $L^{148}$  e  $L^{150}$  na estrutura do FGF-1. Dois diferentes ângulos de visão são apresentados, ambos com (A) e sem (B) a representação do esqueleto peptídico da proteína. Em ambas as imagens, a molécula de FGF-1 sofreu uma rotação em torno do seu eixo de simetria (indicado pela seta).



### 3.4. Desenho, Síntese e Atividade Biológica de peptídeos relacionados ao hFGF-1.

#### 3.4.1. Desenho

A orientação espacial dos resíduos no Sítio 1 nos levou ao desenho de peptídeos que, embora não apresentassem similaridade de estrutura primária em relação ao FGF-1, fossem capazes de dispor os resíduos importantes para a ligação ao receptor em um contexto tridimensional, mimetizando a superfície do Sítio 1.

Levando-se em conta o posicionamento espacial dos carbonos  $\alpha$  dos resíduos de interesse em um mesmo plano, o desenho foi orientado de modo a simular uma superfície rígida em  $\beta$ -hairpin. Deste modo, as cadeias laterais das leucinas e tirosinas ficariam dispostas em uma mesma superfície, ao passo que os demais resíduos seriam alocados na face oposta. Para tanto, tornou-se necessária a imposição de restrições conformacionais nas estruturas através de pontes de dissulfeto ou de lactama. Os peptídeos inicialmente propostos são apresentados a seguir.

#### Dímeros

##### PEPTÍDEO 1



##### PEPTÍDEO 2



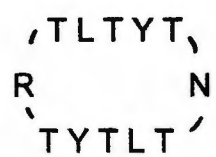
##### PEPTÍDEO 3



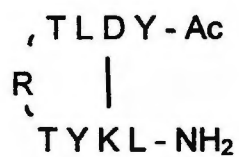
## PEPTÍDEO 4

**Semi-cíclicos ou cíclicos**

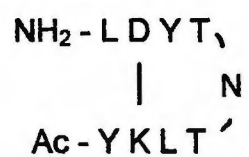
## PEPTÍDEO 5



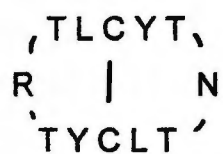
## PEPTÍDEO 6



## PEPTÍDEO 7

**Bicíclicos**

## PEPTÍDEO 8



## PEPTÍDEO 9



## PEPTÍDEO 10



### 3.4.2. Análise conformacional teórica

As estruturas dos peptídeos propostos foram submetidas a um estudo conformacional teórico. Este estudo consistiu em simular os movimentos moleculares internos espontâneos de cada um através de Dinâmica Molecular (DM). Optamos por uma combinação de Dinâmica Molecular de Alta Temperatura (HTMD), para uma rápida, mas efetiva exploração do espaço conformacional, seguida de algumas etapas de resfriamento rápido (inspirado na técnica do “simulated annealing”) para um melhor relaxamento das estruturas estudadas.

As condições empregadas para os cálculos encontram-se listadas a seguir.

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| 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 ( $\epsilon$ ) | 80     |

Nos cálculos de DM, obtivemos um histórico da simulação dos movimentos espontâneos da estrutura estudada, resultando no registro de conformações a cada picossegundo. No final da simulação, pudemos visualizar essa sucessão de conformações, cujos valores de RMS (“root mean square”) obtidos da comparação entre suas coordenadas espaciais permitiram que as

mesmas fossem agrupadas em famílias de conformações. Estruturas representantes de cada família foram então submetidas ao resfriamento (“annealing”) através de uma combinação dos métodos “Steepest Descent” e “Conjugated Gradient”.

#### **3.4.2.1. Dímeros**

A série de peptídeos diméricos revelou uma grande variabilidade conformacional. Os cálculos de dinâmica molecular mostraram que, apesar de haver uma tendência à manutenção da conformação em fitas  $\beta$ , a flexibilidade de rotação em torno da ponte S-S era bastante alta, gerando uma grande possibilidade de conformações para os dímeros.

#### **3.4.2.2. Semi-cíclicos ou cíclicos**

Dentro desta série (5 a 7), observamos uma grande variabilidade conformacional para o peptídeo 5. Neste caso, a ciclização entre as extremidades do peptídeo resultou em uma restrição conformacional ineficaz, sendo que o comportamento deste peptídeo assemelha-se àquele observado para os membros da série de dímeros.

Já os peptídeos 6 e 7 apresentam um ciclo menor, formado por uma ligação lactama entre os resíduos K-D. Nestes dois casos, a flexibilidade foi bem menor em relação ao peptídeo 5 e pudemos observar famílias de conformações preferenciais coletadas durante os cálculos de dinâmica molecular. As cadeias laterais dos resíduos importantes, embora bastante móveis, encontravam-se favoravelmente posicionadas. Como nos demais casos, a natureza modular dos peptídeos propostos permitiria averiguar a influência de resíduos adicionais ao agrupamento hidrofóbico Y, Y, L, L, tais como N e/ou R presentes nas proximidades do sítio de ligação. Estes compostos, portanto, eram fortes candidatos à síntese.

#### **3.4.2.3. Bicíclicos**

Os peptídeos bicíclicos foram os mais rígidos dentre os desenhados. No entanto, observamos que, nos casos em que a ciclização interna era realizada através de pontes lactama (peptídeos 9 e 10), a presença das cadeias laterais da lisina e ácido aspártico e, principalmente, ácido glutâmico chega a provocar

uma torção no plano dos carbonos  $\alpha$  dos demais resíduos, gerando conformações estáveis menos interessantes quanto à orientação das cadeias laterais importantes.

#### **3.4.2.4. Peptídeos selecionados para síntese**

Dentre os 10 peptídeos desenhados (lineares, cíclicos e bicíclicos), selecionamos três que aliavam duas características importantes. Foram escolhidos peptídeos: 1) cujo comportamento nos cálculos se mostraram mais promissores do ponto de vista de sua análise conformacional teórica; 2) cuja síntese era simples e totalmente viável. Estes peptídeos estão representados na **Figura 23**.

O peptídeo F1 foi escolhido com o propósito de verificar se a presença das L e Y, descritas como fundamentais para a ligação ao receptor (Springer et al., 1994) seriam suficientes para conferir atividade mitogênica ao peptídeo. Os compostos F2 e F3 representam a incorporação de um resíduo polar, com ou sem carga, ao núcleo hidrofóbico. Desse modo, ambos os peptídeos poderiam fornecer informações quanto a uma possível necessidade de resíduos polares ou carregados, além dos hidrofóbicos, para a atividade mitogênica. Nesse sentido, consideramos F1 como um controle de F2 e F3 (embora haja diferenças de flexibilidade entre estes compostos).



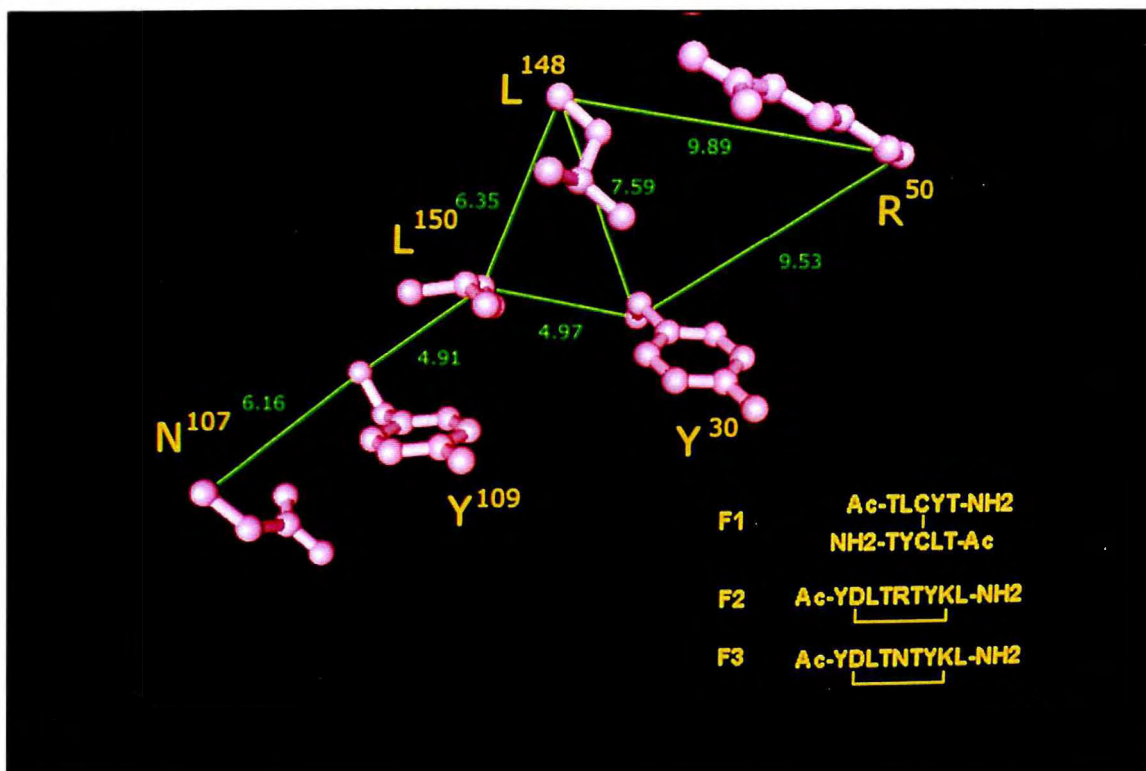


Figura 23. Estruturas dos peptídeos relacionados ao hFGF-1, selecionados para síntese e avaliação da sua atividade biológica.

---

### 3.4.3. Síntese de Peptídeos

A síntese de F1, F2 e F3 forneceu os resultados mostrados na **Tabela 4**. A purificação por RP-HPLC em escala semi-preparativa resultou em baixos rendimentos. A composição rica em aminoácidos apolares, a acetilação e amidação das extremidades e a presença de restrições de conformação conferem a estes peptídeos um caráter bastante hidrofóbico. Este fato, provavelmente, ocasionou a perda de grande parte dos peptídeos durante o processo.

Os graus de pureza estimados através de RP-HPLC em coluna analítica, em dois sistemas de solventes diferentes, estão mostrados na **Tabela 5**. As condições de análise foram:

F1 monomérico: gradiente de 30 a 60% de solvente B em 30 min.

F1 dimérico: gradiente de 35 a 65% de B em 30 min.

F2: gradiente de 30 a 80% de B em 30 min.

F3: gradiente de 20 a 50% de B em 30 min.

Solvente A: 0,1% TFA em água ou TEAP

Solvente B: 0,09% TFA em 80% ACN/água ou 80% ACN/TEAP.

Os perfis cromatográficos obtidos durante o processo de purificação em TFA são apresentados nas **Figuras 24 e 25**. Em ambos os sistemas, o grau de pureza observado para cada peptídeo foi superior a 95 % (**Tabela 5**).

Os dados obtidos na caracterização dos compostos por análise de aminoácidos e espectrometria de massa estão descritos nas **Tabelas 5 e 6**.

Tabela 4. Rendimentos obtidos para a síntese dos peptídeos F1, F2 e F3.

| Peptídeo      | Massa inicial de resina (MBHA; mg) | Massa final de peptídeo-resina (mg) | Massa submetida à clivagem e desproteção total (mg) | Massa de peptídeo bruto obtido (mg) | Massa de peptídeo purificado (mg) | Rendimento (%) |
|---------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| F1 (monômero) | 260                                | 445,5                               | 445,5   | 60                                  | 4,3                               | 4,8            |
| F1 (dímero)   |                                    |                                     |   | 100                                 | 4,7                               | 4,5            |
| F2            | 260                                | 573,5                               | 290   | 123                                 | 5,2                               | 5,0            |
| F3            | 260                                | 550                                 | 270   | 112                                 | 4,8                               | 4,9            |

Tabela 5. Determinação do grau de pureza por RP-HPLC e caracterização dos peptídeos através de espectrometria de massa.

| Peptídeo      | Grau de Pureza (%) | FAB-MS ([M+H] <sup>+</sup> ) |           |
|---------------|--------------------|------------------------------|-----------|
|               |                    | Calculado                    | Observado |
| F1 (monômero) | > 96               | 640,8                        | 641,3     |
| F1 (dímero)   | > 96               | 1278,8                       | 1279,3    |
| F2            | > 96               | 1195,5                       | 1196      |
| F3            | > 96               | 1153,4                       | 1153,9    |

Tabela 6. Proporções molares entre os aminoácidos presentes nos diferentes peptídeos, bem como sua relação com os valores esperados\*.

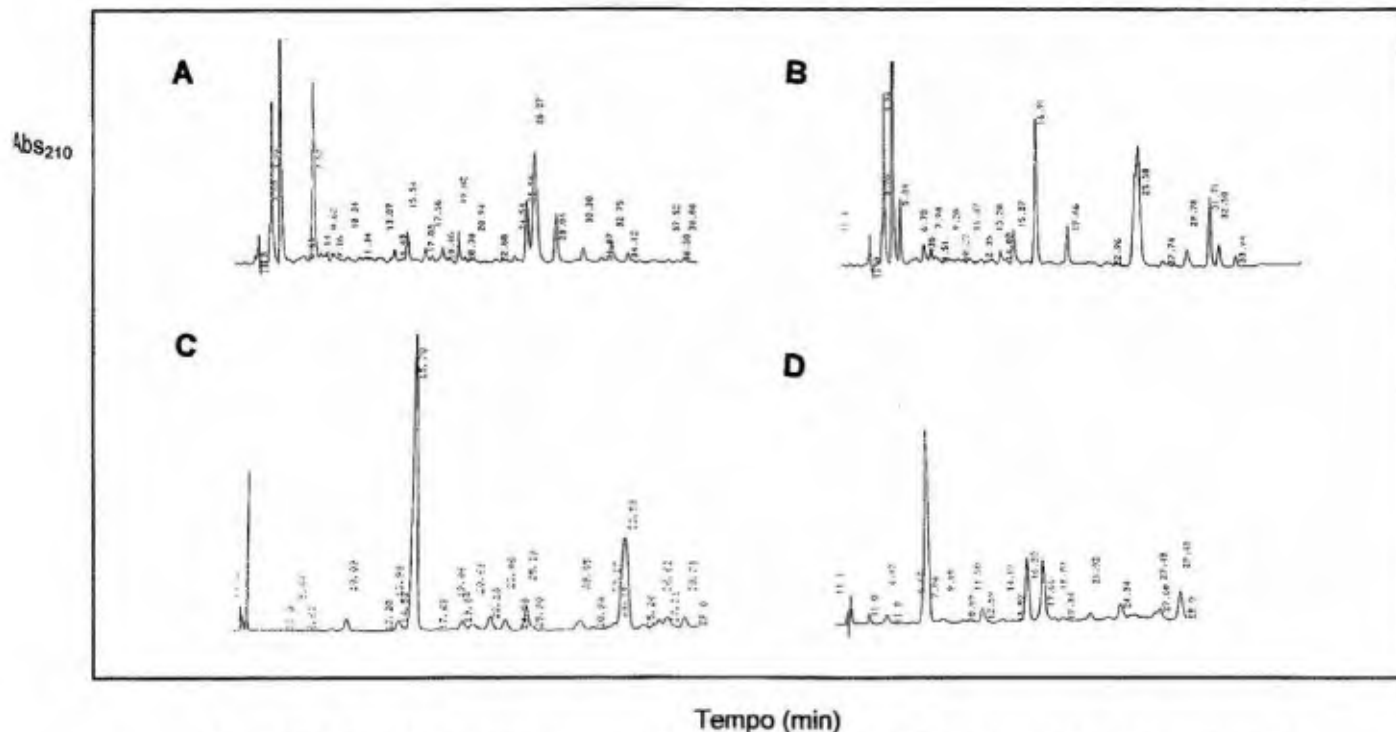
| F1 (mon.) | T    | L    | C    | Y    |
|-----------|------|------|------|------|
| Esp.      | 2,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Obs.      | 1,89 | 1,00 | nd.  | 1,98 |

| F1 (dim.) | T    | L    | C    | Y    |
|-----------|------|------|------|------|
| Esp.      | 4,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Obs.      | 3,96 | 2,00 | nd.  | 2,01 |

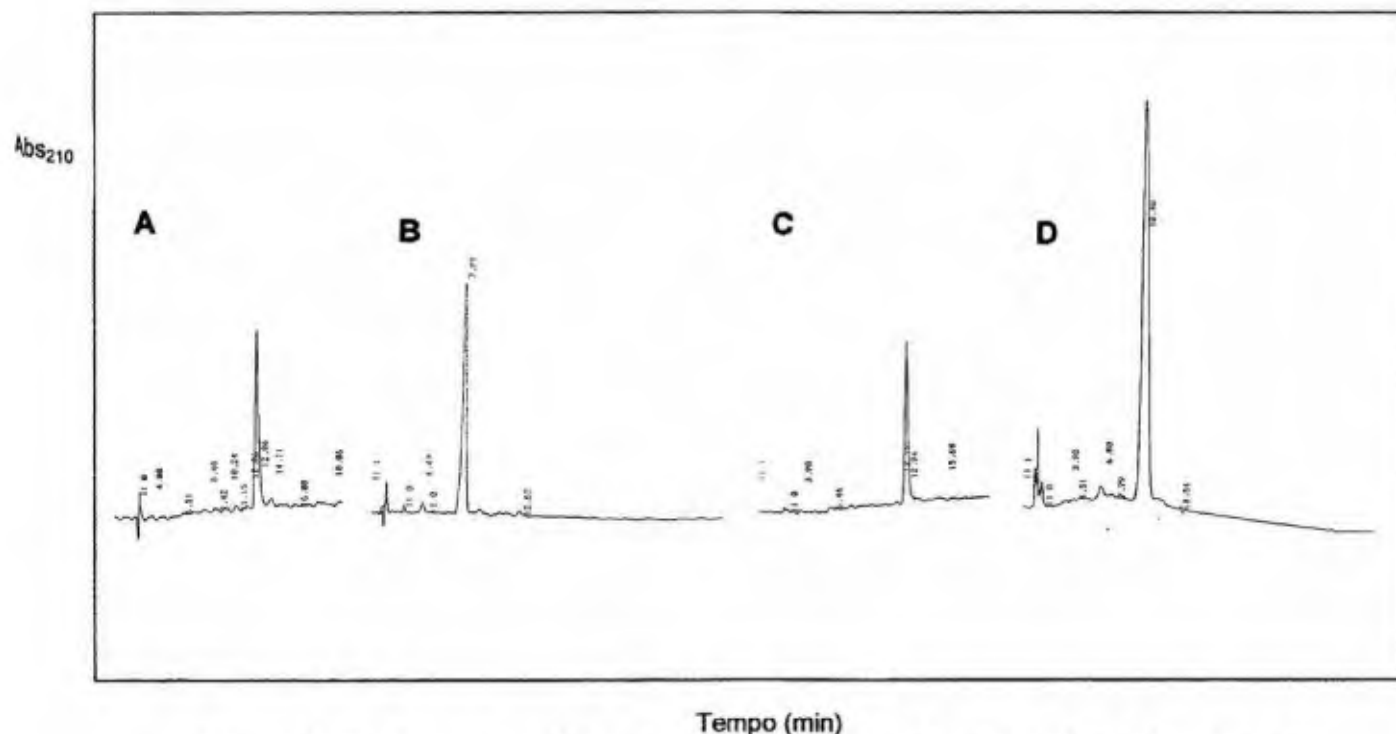
| F2   | Y    | D    | L    | T    | R    | K    |
|------|------|------|------|------|------|------|
| Esp. | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 2,00 | 1,00 | 1,00 |
| Obs. | 1,98 | 1,04 | 2,00 | 1,95 | 0,97 | 1,02 |

| F2   | Y    | D    | L    | T    | N    | K    |
|------|------|------|------|------|------|------|
| Esp. | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 1,00 |
| Obs. | 2,01 | 0,96 | 2,00 | 0,94 | 1,95 | 0,98 |

\* Os valores observados para cada aminoácido foram normalizados em relação ao valor da Leucina, aminoácido estável nas condições de hidrólise. O método de hidrólise empregado (HCl 6N a 110°C por 24h) ocasiona a oxidação da cisteína, impedido sua detecção. nd. não detectado.



**Figura 24. Perfis cromatográficos dos peptídeos brutos.** A. Peptídeo F1 (monômero): 30 a 70 % de solvente B em 40 min.; B. Peptídeo F1 (dímero): 30 a 70 % de B em 40 min.; C. Peptídeo F2: 20 a 40% de B em 40 min.; D. Peptídeo F3: 20 a 50 % de B em 30 min. Solvente A: 0,1 % TFA em H<sub>2</sub>O; solvente B: 60 % ACN/H<sub>2</sub>O contendo TFA 0,09 %, para as condições A e B; 80 % ACN/H<sub>2</sub>O contendo TFA 0,09 %, para as condições C e D.



**Figura 25. Perfis cromatográficos dos peptídeos purificados.** A. Peptídeo F1 (monômero): 20 a 40 % de solvente B em 20 min.; B. Peptídeo F1 (dímero): 30 a 50 % de B em 20 min.; C. Peptídeo F2: 20 a 50% de B em 30 min.; D. Peptídeo F3: 20 a 50 % de B em 30 min. Solvente A: 0,1 % TFA em H<sub>2</sub>O; solvente B: 60 % ACN/H<sub>2</sub>O contendo TFA 0,09 %, para as condições A e B; 80 % ACN/H<sub>2</sub>O contendo TFA 0,09 %, para as condições C e D.

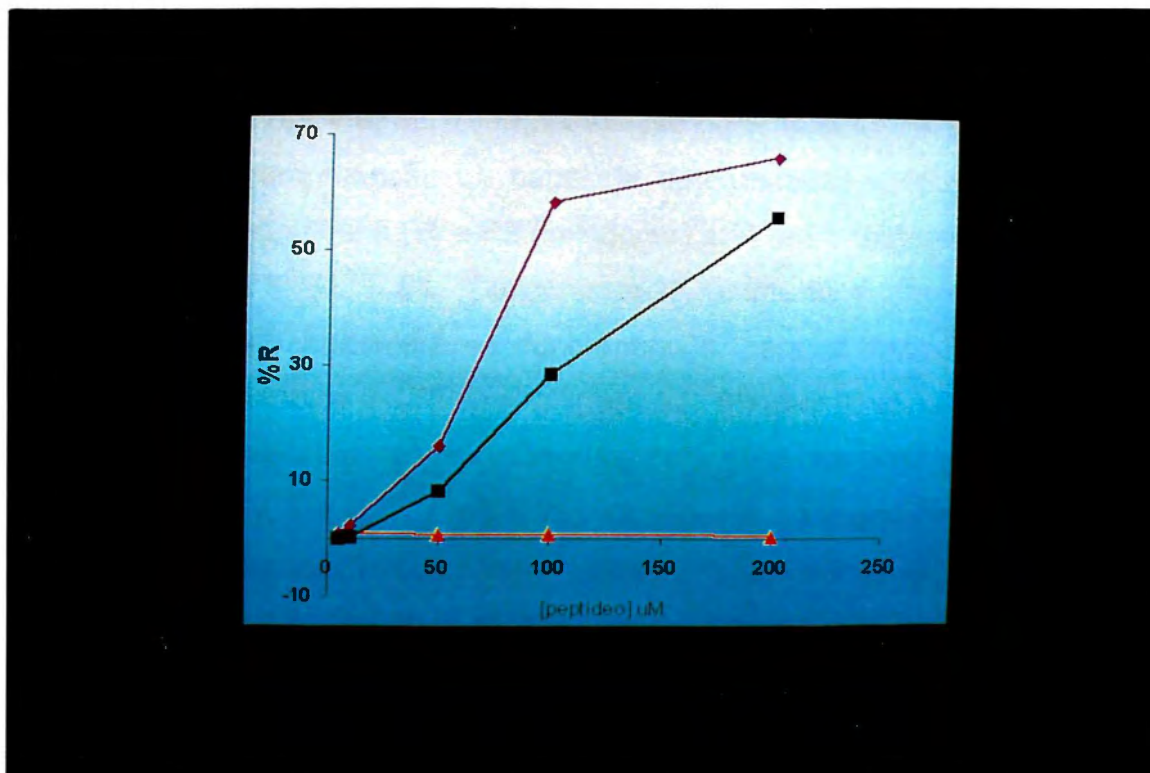
---

#### 3.4.4. Atividade Biológica

Os peptídeos F1, F2 e F3 também foram avaliados quanto à sua capacidade de estimular a síntese de DNA em fibroblastos em cultura. Os dados obtidos (**Figura 26**) mostram que, na faixa de concentração testada (1 a 200  $\mu\text{M}$ ), o peptídeo dimérico F1 é inativo. Da mesma forma, o peptídeo correspondente à forma monomérica do peptídeo F1 mostrou-se incapaz de induzir a proliferação celular (não representado). O peptídeo F2 apresentou atividade mitogênica ( $\text{ED}_{50} = 60 - 70 \mu\text{M}$ ), estimulando a incorporação de timidina tritiada em até 66 % do valor máximo induzido por 10 % de soro fetal bovino. Na mesma faixa de concentração, o peptídeo F3 apresentou atividade em níveis inferiores ( $\text{ED}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) aos apresentados pelo peptídeo F2.

Estes resultados indicam que os peptídeos F2 e F3 podem estar mimetizando a superfície correspondente a um sítio de ligação no FGF-1 (Sítio 1) e ligando-se ao receptor. Além disso, o fato de F2 ser mais ativo que F3 indica que, além dos resíduos hidrofóbicos Y e L (presentes em ambos), o resíduo R presente em F2 exerce um importante papel para a atividade mitogênica do peptídeo.





**Figura 26. Atividade mitogênica dos peptídeos F1 (triângulo), F2 (losango) e F3 (quadrado) sobre fibroblastos 3T3 em cultura.**

---

### 3.5. Avaliação final

#### 3.5.1. Modelo teórico e peptídeos relacionados à estrutura do FGFR-1 $\beta$

Recentemente, após havermos concluído este trabalho, dois grupos de pesquisa elucidaram, através de difração de raios X, as estruturas tridimensionais dos complexos FGF-1/FGFR-2 (Stauber et al., 2000) e FGF-2/FGFR-1 (Plotnikov et al., 1999). A análise de ambas as estruturas possibilita uma melhor compreensão do papel de determinados resíduos na atividade biológica dos peptídeos R1 e R2 (inibidores) e F2 e F3 (mitogênicos). No FGF-1, os resíduos Y<sup>30</sup>, L<sup>148</sup> e L<sup>150</sup> encontram-se na interface com o domínio DII do receptor e são considerados fundamentais para a manutenção de uma interação hidrofóbica FGF/FGFR (Figura 27; Stauber et al., 2000; Plotnikov et al., 1999). No receptor, as estruturas dos complexos revelam a importância dos resíduos D<sup>99</sup>, V<sup>101</sup> e R<sup>103</sup> (Figura 28), localizados no segmento conectivo entre DII e DIII, para a interação com o FGF-1. Estes resultados corroboram os nossos dados experimentais obtidos com peptídeos sintéticos.

A comparação do nosso modelo teórico para os domínios extracelulares do FGFR-1 com os dados experimentais (Figura 29) revela que a principal diferença entre ambos reside na orientação relativa entre os domínios DII e DIII. A principal razão para esta discrepância reside no fato de a estrutura teórica ter sido construída e refinada em ausência da molécula de FGF. O segmento conectivo, por si só, não é capaz de conferir a rigidez necessária ao correto posicionamento dos domínios, como acontece no caso do HGHR ou EPOR que utilizamos como modelo. Os dados experimentais, por outro lado, foram obtidos através da co-cristalização FGF/FGFR. A presença do FGF, portanto, é necessária para orientar apropriadamente o ângulo entre os domínios (Figura 29).

Apesar destas diferenças, o nosso modelo nos permitiu posicionar corretamente os resíduos pertencentes ao segmento conectivo, bem como sua exposição ao solvente. Além disso, forneceu-nos informações importantes para o desenho dos peptídeos R1, R2 e R3 que, ao final, mostraram-se ativos (R1 e R2).

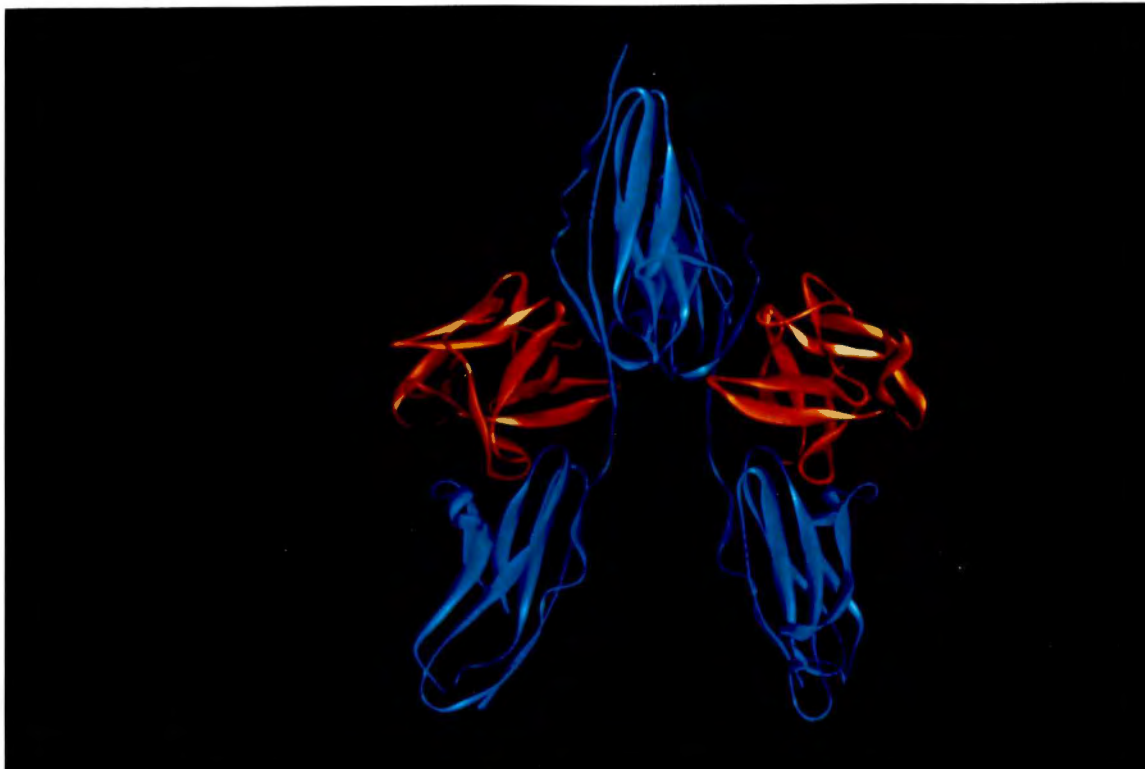


Figura 27. Estrutura tridimensional do complexo FGF-1 (laranja)/FGFR-2 (azul), determinada através de difração de raios X (Stauber et al., 2000).

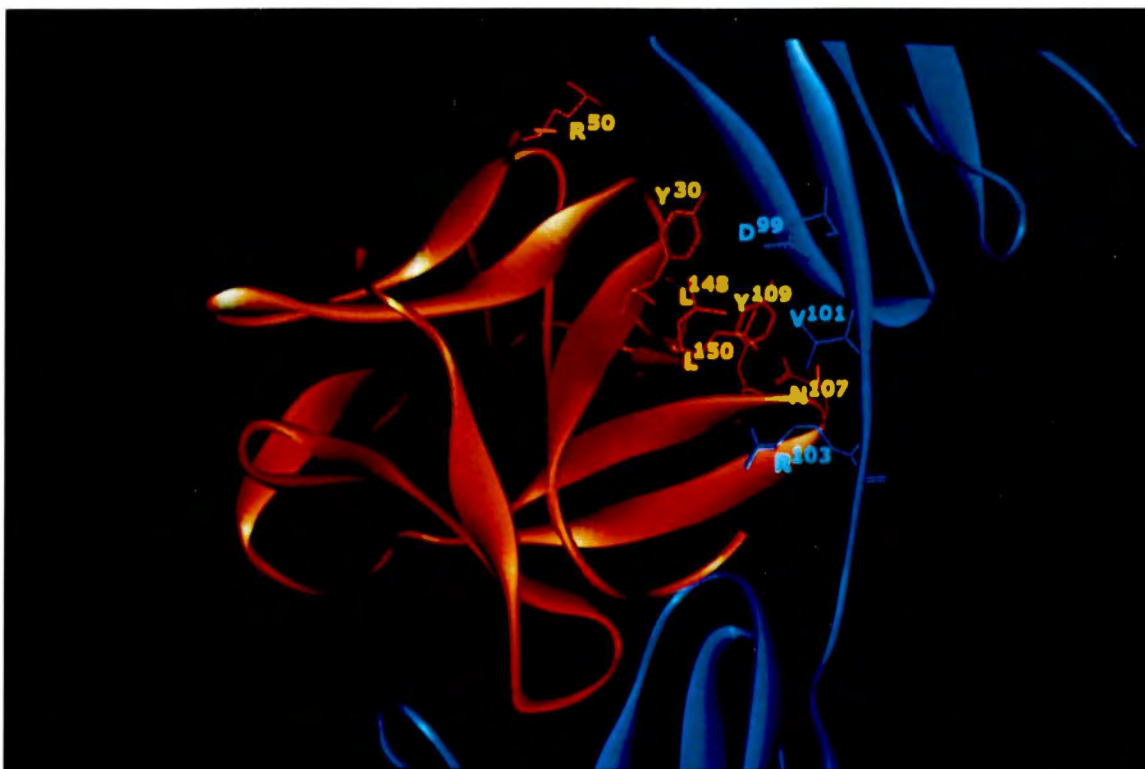
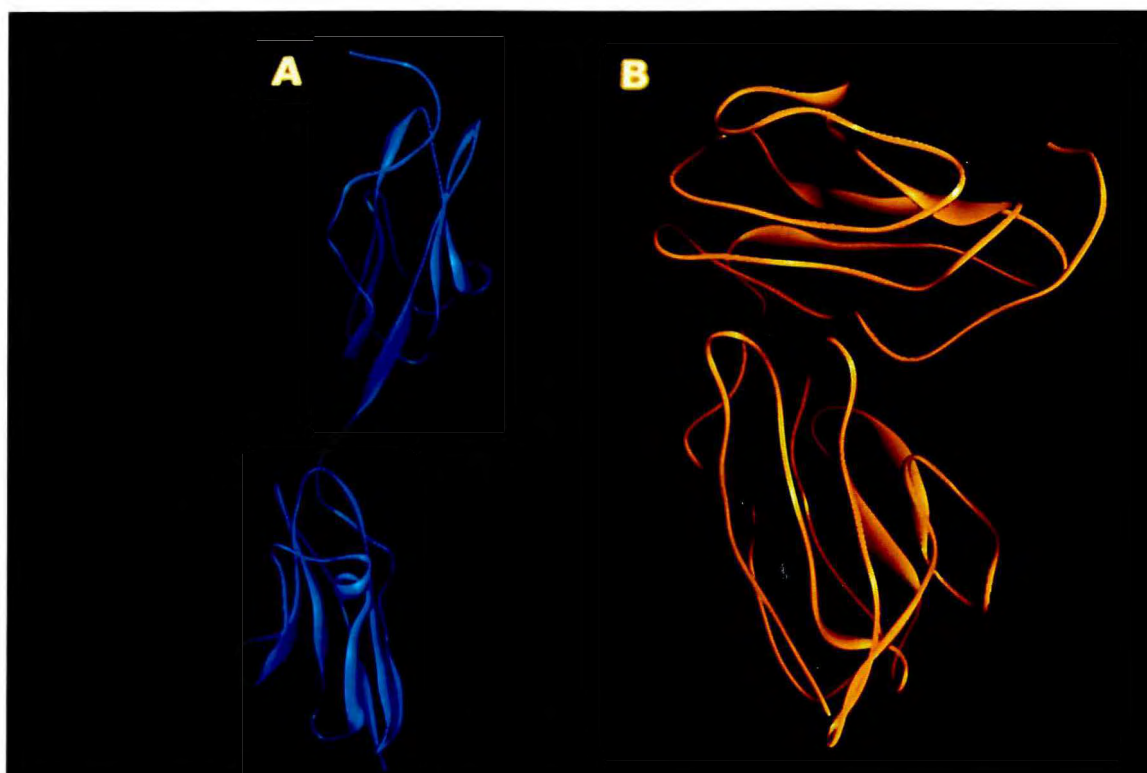


Figura 28. Detalhamento do complexo FGF-1 (laranja) / FGFR-2 (azul) ressaltando o posicionamento espacial dos resíduos participantes da superfície de contato (Stauber et al., 2000).



**Figura 29. Estruturas tridimensionais do FGFR-1.** A. Estrutura cristalina (Plotnikov et al., 1999); B. Modelo teórico (Oyama et al., 1997).

Até o momento, dois peptídeos relacionados à sequência primária de receptores dos FGFs foram descritos. Kan e colaboradores (1993) sintetizaram um peptídeo de 18 resíduos correspondente a uma região do receptor rica em lisinas. Este composto mostrou-se capaz de se ligar à heparina. Um peptídeo de 25 resíduos correspondente a um segmento do receptor de FGF-7 (KGF) foi capaz de inibir a atividade mitogênica do FGF-7 sobre células Balb.MK em cultura (Bottaro et al., 1993). A faixa de concentrações em que estes peptídeos apresentaram atividade é similar à encontrada para os peptídeos R1 e R2 descritos no presente trabalho (da ordem de  $\mu\text{M}$ ).

A importância dos nossos resultados frente aos acima descritos reside no fato de que o peptídeo R1 é composto por apenas 9 resíduos. Esta minimização pode ser útil para o desenvolvimento de compostos não peptídicos capazes de antagonizar as atividades dos FGFs. O peptídeo R2 ainda não é um bom composto líder para isso. Por outro lado, a aperfeiçoamento do seu desenho, agora que contamos com a estrutura cristalina do complexo FGF/FGFR, poderá levar a compostos promissores.

### **3.5.2. Peptídeos relacionados à estrutura do FGF-1**

Os resultados descritos no presente trabalho devem ser incluídos em um contexto mais amplo. Há alguns anos, vimos utilizando peptídeos sintéticos como ferramenta para o estudo do complexo sinalizador dos FGFs, representado pelo fator, o seu receptor de membrana e o heparan sulfato.

Inicialmente, trabalhos descritos na literatura salientavam a importância de um segmento na molécula de FGF-2 para a atividade biológica desta proteína (Baird et al., 1988). Com base nestes dados, sintetizamos uma série de peptídeos lineares correspondentes a esta região, de modo a encobrir toda a sequência através de pequenos fragmentos. Os resultados nos levaram à sequência  $^{107}\text{WFVGLKKNKGSSKRGPR}^{123}$ . O peptídeo correspondente foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos 3T3 em cultura quando testado na faixa de 1-100  $\mu\text{M}$ , além de apresentar afinidade por heparina (Oyama et al., 1996).



Posteriormente, estudos mais detalhados de modelagem molecular permitiram o desenho de outros peptídeos relacionados ao Sítio 2 do hFGF-1, alguns deles baseados neste peptídeo. Nesta segunda etapa, os peptídeos foram desenhados de modo a mimetizar tridimensionalmente uma alça da molécula de FGF-1, através da imposição de restrições conformacionais, tais como ciclização por pontes de dissulfeto ou de lactama. Novamente neste caso, alguns dos peptídeos desenhados apresentaram atividade mitogênica. O melhor peptídeo obtido através desta abordagem foi o composto cíclico c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH<sub>2</sub>] (Kiyota et al., 2000). É importante salientar que o análogo linear deste peptídeo é inativo. Contudo, os níveis de atividade biológica do peptídeo cíclico são similares aos obtidos anteriormente.

O conjunto dos resultados por nós obtidos até o momento permite-nos delinear um perfil comum a todos os peptídeos mitogênicos. Estes compostos apresentam, via de regra, um conjunto de aminoácidos apolares que confere um núcleo hidrofóbico ao peptídeo. Contudo, podemos concluir das experiências com os peptídeos F1 a F3 (Tabela 7) que a presença deste núcleo não é suficiente para desencadear a resposta biológica. Há a necessidade de se agregar ao núcleo hidrofóbico resíduos de aminoácidos polares, preferencialmente positivamente carregados: o peptídeo F2 contendo um resíduo de arginina é mais potente que F3, que contém um resíduo de asparagina (Figura 26).

**Tabela 7. Comparação entre os níveis de atividade mitogênica exibidos por alguns dos principais peptídeos estudados até o momento.**

| Peptídeo                               | ED <sub>50</sub> (μM) |                     |
|--|-----------------------|---------------------|
| Ac-WFVGLKKNKGSSKRGPRN-NH <sub>2</sub>  | 10-20                 | Oyama et al., 1996  |
| c(1-5)[Ac-CKKHCEKNWF-NH <sub>2</sub> ] | 50                    | Kiyota et al., 2000 |
| Ac-SKKHAEKNWF-NH <sub>2</sub>          | >1000                 | Kiyota et al., 2000 |
| c(2-8)[Ac-YDLTRTYKL-NH <sub>2</sub> ]  | 60-70                 | Oyama et al., 2001  |
| c(2-8)[Ac-YDLTNTYKL-NH <sub>2</sub> ]  | > 100                 | Oyama et al., 2001  |

Recentemente, foi descrito um peptídeo cuja sequência não apresenta homologia com nenhum FGF conhecido, mas que ainda assim é capaz de se ligar ao FGFR (Ballinger et al., 1999). À esta sequência foi adicionado, através de um segmento conectivo composto por glicinas, um domínio correspondente ao zíper de leucina da proteína c-jun, que sabidamente é capaz de se ligar à heparina. O peptídeo resultante, dimerizado por pontes de dissulfeto, tem 124 resíduos e é, na verdade, uma proteína de tamanho próximo ao do FGF. Apesar de não apresentar nenhuma similaridade estrutural ou de sequência com esta proteína, o polipeptídeo é bastante potente quanto à capacidade de estimular a proliferação celular ( $ED_{50} = 240 \text{ pM}$ ). O peptídeo sem o domínio contendo zíper de leucina liga-se ao FGFR, mas é incapaz de desencadear uma resposta mitogênica.

No nosso caso, é possível que a associação de peptídeos cujos desenhos representem diferentes domínios dos FGFs possa levar a resultados semelhantes.

---

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, J. A.; Mergia, A.; Whang, J. L.; Tumolo, A.; Friedman, J.; Hjerrild, K. A.; Gospodarowicz, D. & Fiddes, J. C. (1986) Nucleotide Sequence of a Bovine Clone Encoding the Angiogenic Protein, basic Fibroblast Growth Factor. *Science* **233**, 545-548.
- Ago, H.; Kitagawa, Y.; Fujishima, A.; Matsuura, Y. & Katsube, Y. (1991) Crystal Structure of Basic Fibroblast Growth Factor at 1.6 Å Resolution. *J. Biochem.* **110**, 360-363.
- Armelin, H. A. (1973) Pituitary Extracts and Steroid Hormones in the Control of 3T3 Cell Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2702-2706.
- Baird, A. & Klagsbrum, M. (1991) The Fibroblast Growth Factor Family. *Cancer Cells* **3**, 239-243.
- Baird, A.; Esch, F.; Mormède, P.; Ueno, N.; Ling, N.; Böhlen, P.; Ying, S.-Y.; Wehrenberg, W. B. & Guillemin, R. (1986) Molecular Characterization of Fibroblast Growth Factor: Distribution and Biological Activities in Various Tissues. *Recent Progress in Hormone Research* **42**, 143-205.
- 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.
- Ballinger, M. D.; Shyamala, V.; Forrest, L. D.; Deuter-Reinhard, M.; Doyle, L. V.; Wang, J. X.; Panganiban-Lustan, L.; Stratton, J. R.; Apell, G.; Winter, J. A.; Doyle, M. V.; Rosenberg, S. & Kavanaugh, W. M. Semirational Design of a Potent, Artificial Agonist of Fibroblast Growth Factor Receptors. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1199-204.
- Bateman, A. & Chothia, C. (1995) Outline Structures for the Extracellular Domains of the Fibroblast Growth Factor Receptors. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 1068-1074.
- Bellot, F.; Crumley, G.; Kaplow, J. M.; Schlessinger, J.; Jaye, M. & Dionne, C. A. (1991) Ligand-induced Transphosphorylation Between Different FGF Receptors. *EMBO J.* **10**, 2849-2854.
- Blaber, M., DiSalvo, J. and Thomas, K. A. (1996) X-ray crystal structure of human acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry* **35**, 2086-2084.

- 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**, 9180-9183.
- Burgess, W. H. & Maciag, T. (1989) The Heparin-binding (Fibroblast Growth Factor) Family of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 575-606.
- de Vos, A. M.; Ultsch, M. & Kossiakoff, A. A. (1992) Human Growth Hormone and Extracellular Domain of its Receptor: Crystal Structure of the Complex. *Science* **255**, 306-312.
- DelliBovi, P.; Curatola, A. M.; Kern, F. G.; Greco, A.; Ittmann, M. & Basilico, C. (1987) An Oncogene Isolated by Transfection of Kaposi's Sarcoma DNA Encodes a Growth Factor that is a Member of the FGF Family. *Cell* **50**, 729-737.
- Dionne, C. A.; Crumley, G.; Bellot, F.; Kaplow, J. M.; Searfross, G.; Ruta, M.; Burgess, W. H.; Jaye, M. & Schlessinger, J. (1990) Cloning and Expression of Two Distinct High-Affinity Receptors Cross-Reacting with acidic and basic Fibroblast Growth Factors. *EMBO J.* **9**, 2685-2692.
- Epp, O.; Lattman, E. E.; Schiffer, M.; Huber, R. & Palm, W. (1975) The Molecular Structure of a Dimer Composed of the Variable Portions of the Bence-Jones Protein REI refined at 2.0-Å Resolution. *Biochemistry* **14**, 4943-452.
- Eriksson, E. A.; Cousens, L. S.; Weaver, L. H. & Matthews, B. W. (1991) Three-Dimensional Structure of Human Basic Fibroblast Growth Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3441-3445.
- Finch, P. W.; Rubin, J. S.; Miki, T.; Ron, D. & Aaronson, S. A. (1989) Human KGF is FGF-Related With Properties of a Paracrine Effector of Epithelial Cell Growth. *Science* **245**, 752-755.
- Folkman, J. & Klagsbrun, M. (1987) Angiogenic Factors. *Science* **235**, 442-447.
- Gallagher, J. T.; Turnbull, J. E. & Lyon, M. (1992) Patterns of Sulphation in Heparan Sulphate: Polymorphism Based on a Common Structural Theme. *Int. J. Biochem.* **24**, 553-556.
- Galzie, Z.; Kinsella, A. R. & Smith, J. A. (1997) Fibroblast Growth Factors and their receptors. *Biochem. Cell. Biol.* **75**, 669-685.
- Gambarini, A. G.; Miyamoto, C. A.; Lima, G. A.; Nader, H. B. & Dietrich, C. P. (1993) Mitogenic Activity of acidic Fibroblast Growth Factor is Enhanced by

- Highly Sulfated Oligosaccharides Derived from Heparin and Heparan Sulfate. *Mol. Cell. Biochem.* **124**, 121-129.
- Gimenez-Gallego, G.; Rodkey, J.; Bennett, C.; Rios-Candelore, M.; Disalvo, J. & Thomas, K. (1985) Brain-derived acidic Fibroblast Growth Factor: Complete Amino Acid Sequence and Homologies. *Science* **230**, 1385-1838.
- Gospodarowicz, D. & Cheng, J. (1986) Heparin Protects basic and acidic Fibroblast Growth Factors from Inactivation. *J. Cell. Physiol.* **128**, 475-484.
- Gospodarowicz, D. & Moran, J. (1974) Effect of a Fibroblast Growth Factor, Insulin, Dexamethasone, and Serum on the Morphology of Balb/c 3T3 Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 4648-4652.
- Gospodarowicz, D. (1974) Localization of a Fibroblast Growth Factor and its Effect Alone and with Hydrocortisone on 3T3 Cell Growth. *Nature* **249**, 123-127.
- Gospodarowicz, D.; Neufeld, G. & Schweigerer, L. (1986) Fibroblast Growth Factor. *Mol. Cell. Endocrin.* **46**, 187-206.
- Gospodarowicz, D.; Weseman, F. & Moran, J. (1975) Presence in the Brain of a Mitogenic Agent Distinct from Fibroblast Growth Factor that Promotes the Proliferation of Myoblasts in Low Density Culture. *Nature* **256**, 216 -220.
- Harpaz, Y. & Chothia, C. (1994) Many of the Immunoglobulin Superfamily Domains in Cell Adhesion Molecules and Surface Receptors Belong to a New Structural Set which is Close to that Containing Variable Domains. *J. Mol. Biol.* **238**,528-539.
- Heldin, C.-H. (1995) Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction. *Cell* **80**, 213-223.
- Hoffman, R. S. (1940) *Growth* **4**, 361-376.
- Holden, H. M.; Ito, M.; Hartshorne, D. J. & Rayment, I. (1992) X-ray Structure Determination of Telokin, the C-terminal Domain of Myosin Light Chain Kinase, at 2.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **227**,840-851.
- Houssaint, E.; Blanquet, P. R.; Champion-Arnaud, P.; Gesnel, M. C.; Torriglia, A.; Courtois, Y. & Breathnach, R. (1990) Related Fibroblast Growth Factor Receptor Genes Exist in the Human Genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8180-81-84.
- 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 Growth Factor: Cloning, Nucleotide Sequence, and Chromosome Localization. *Science* **233**, 541-545.
- 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.
- Johnson, D. E. & Williams, L. T. (1993) Structural and Functional Diversity in the FGF Receptor Multigene Family. *Advances in Cancer Research* **60**, 1-41.
- Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D. & Cook, P. I. (1970) Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595-598.
- 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.
- Keegan, K.; Johnson, D. E.; Williams, L. T. & Hayman, M. J. (1991) Isolation of an Additional Member of the Fibroblast Growth Factor Receptor Family, FGFR-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1095-1099.
- Kiyota, S. (2000) Peptídeos de Conformação Restrita Relacionados ao Sítio 2 do Fator de Crescimento de Fibroblastos Ácido Humano (hFGF-1): Estudo sobre Estrutura e Atividade. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Kiyota, S.; Gambarini, A. G.; Viviani, W.; Oyama, S.; Toma, I. N.; Sykes, B. D. & Miranda, M. T. M. (1999) New Synthetic Peptides derived from human Fibroblast Growth Factor-1: Search for Agonists and Inhibitors. In: Tam, J. P. & Kauamaya, P. T. P. (Eds.) *Peptides: Frontiers of Peptide Science*, ESCOM/Kluwer, The Netherlands, Proceedings of the 15<sup>th</sup> American Peptide Symposium, 641-642.
- Lee, P. L.; Johnson, D. E.; Coussens, L. S.; Fried, V. A. & Williams, L. T. (1989) Purification and Complementary DNA cloning of a Receptor for basic Fibroblast Growth Factor. *Science* **245**, 57-60.
- Livnah, O.; Stura, E. A.; Johnson, D. L.; Middleton, S. A.; Mulcahy, L. S.; Wrighton, N. C.; Dower, W. J.; 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.

- Marics, J.; Adelaide, J.; Raybaud, F.; Mattei, M. G.; Coulier, F.; Planche, J.; Lapeyriere, O. & Birnbaum, D. (1989) Characterization of the hst-Related FGF-6 Gene, a New Member of the Fibroblast Growth Factor Gene Family. *Oncogene* **4**, 335-340.
- Merrifield, R. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.
- Miyamoto, M.; Naruo, K. I.; Seko, C.; Matsumoto, S.; Kondo, T. & Kurokawa, T. (1993) Molecular Cloning of a Novel Cytokine cDNA Encoding the Ninth Member of the Fibroblast Growth Factor Family, Which Has a Unique Secretion Property. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4251-4259.
- Moore, R.; Casey, G.; Brookes, S.; Dixon, M.; Peters, G. & Dickson, C. (1986) Sequence, Topography and Protein Coding Potential of Mouse int-2: a putative Oncogene Activated by Mouse Mammary Tumor Virus. *EMBO J.* **5**, 919-924.
- Moore, S. & Stein, W. H. (1954) The Free Amino Acids of Blood Plasma. *J. Biol. Chem.* **211**, 907-913.
- Moscattelli, 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 Production by Bovine Capillary Endothelial Cells. *J. Cell. Physiol.* **131**, 123-130.
- Moscattelli, D. (1988) Metabolism of Receptor-bound and Matrix-bound basic Fibroblast Growth Factor by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Biol.* **107**, 753-759.
- Muenke, M. & Schell, U. (1995) Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders *Trends in Genetics* **11**, 308-313.
- Mulloy, B., Forster, M. J., Jones, C., Drake, A. F., Johnson, E. A. and Davies, D. B. (1993) NMR and Molecular Modelling Studies of the solution conformation of Heparin. *Biochem. J.* **293**, 849-859.
- Murzin, A. G.; Lesk, A. M. & Chothia, C. (1992)  $\beta$ -Trefoil Fold - Patterns of Structures and Sequence in the Kunitz Inhibitors, Interleukins-1 $\alpha$  and 1 $\beta$  and Fibroblast Growth Factors. *J. Mol. Biol.* **223**, 531-543.
- Nader, H. B.; Porcionatto, M. A.; Tersariol, I. V. S., Pinhal, M. A. S.; Oliveira, F. W.; Moraes, C. T. & Dietrich, C. P. (1990) Purification and Substrate Specificity of Heparitinase I and Heparitinase II from *Flavobacterium*

- heparinum*: Analyses of the Heparin and Heparan Sulfate Degradation Products by  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **265**, 16807-16813.
- Naski, M. C. & Ornitz, D. M. (1998) FGF signaling in skeletal development. *Front. Biosci.* **3**, D781-D794.
- Nugent, M. A. & Iozzo, R. V. (2000) Fibroblast Growth Factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 115-120.
- Ornitz, D. M.; Yayon, A.; Flanagan, J. G.; Svahn, C. M.; Levi, E. & Leder, P. (1992) Heparin is required for cell-free binding of bFGF to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 240-247.
- Oyama Jr., S. (1995) Peptídeos Sintéticos Relacionados à Estrutura Primária do "Fibroblast Growth Factor-1" Humano (hFGF-1): Estudos Estruturais e Funcionais. Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Oyama Jr., S.; Gambarini, A. G. & Miranda, M. T. M. (2001) Em preparação.
- Oyama Jr., S.; Kiyota, S.; Miranda, M. T. M.; Gambarini, A. G. & Viviani, W. (1997) Three-dimensional Model Structure for the Extracellular Domains of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR-1). *J. Mol. Model.* **3**, 233-239.
- 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. G. (1996) Mitogenic Activity of Peptides related to the sequence of human Fibroblast Growth Factor-1. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **39**, 1237-1244.
- Pantoliano, M. W.; Horlick, R. A.; Springer, B. A.; VanDyk, D. E.; Tobery, T.; Wetmore, D. R.; Lear, J. D.; Nahapetian, 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.
- Partanen, J.; Makela, T. P.; Eerola, E.; Korhonen, J.; Hirvonen, H.; Claesson-Welsh, L. & Alitalo, K. (1991) FGFR-4, a Novel acidic Fibroblast Growth Factor Receptor with a Distinct Expression Pattern. *EMBO J.* **10**, 1347-1354.
- Pasquale, E. & Singer, S. J. (1989). Identification of a Developmentally Regulated Protein-Tyrosine Kinase by Using anti-Phosphotyrosine

- Antibodies to Screen a cDNA Expression Library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5449-5453.
- Plotnikov, A. N.; Hubbard, S. R.; Schlessinger, J. & Mohammadi, M. (2000) Crystal Structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* **101**, 413-424.
- Plotnikov, A.N. ; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R. & Mohammadi, M. (1999) Structural Basis for FGF Receptor Dimerization and Activation. *Cell* **98**, 641-650.
- Schlessinger, J.; Lax, I. & Lemmon, M. (1995) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* **83**, 357-360.
- Shing, Y.; Folkman, J.; Sullivan; R.; Butterfield, C.; Murray, J. & Klagsbrun, M. (1984). Heparin-affinity: Purification of a Tumor-derived Capillary Endothelial Cell Growth Factor. *Science* **223**, 1296-1298.
- Silva, M. E. & Dietrich, C. P. (1975) Structure of Heparin: Characterization of the Products Formed from Heparin by the Action of a Heparinase and a Heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.* **250**, 6841-6846.
- Spackman, D. H.; Stein, W. H. & Moore, S. (1958) Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.* **30**, 1190.
- Springer, B. A.; Pantoliano, M. W.; Barbera, F. A.; Gunyuzlu, 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**, 26879-26884.
- Stauber, D. J.; DiGabriele, A. D. & Hendrickson, W. A. (2000) Structural interactions of Fibroblast Growth Factor Receptor with its Ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 49-54.
- Stewart, J. M. & Young, J. D. (1984) Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical Co. 2nd ed., Rockford, IL.
- Sudhalter, J.; Folkman, J.; Svahn, C. M.; Bergendal, K.; D'Amore, P. A. (1989) Importance of Size, Sulfation, and Anticoagulant Activity in the Potentiation of acidic Fibroblast Growth Factor by Heparin. *J. Biol. Chem.* **264**, 6892-6897.

- Tanaka, A.; Miyamoto, K.; Minamino, N.; Takeda, M.; Sato, M.; Matsuo, H. & Matsumoto, K. (1992) Cloning and Characterization of an Androgen-Induced Growth Factor Essential for the Androgen-Dependent Growth of Mouse Mammary Carcinoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8928-8932.
- 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.
- Trowell, O. A.; Chir, B. & Willmer, E. N. (1939) *J. Exp. Biol.* **16**, 60-70.
- Ueno, H.; Gunn, M.; Dell, K.; Tseng, A., Jr. & Williams, L. T. (1992) A Truncated Form of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Inhibits Signal Transduction by Multiple Types of Fibroblast Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 1470-1476.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. *Cell* **61**, 203-212.
- Vlodavsky, I. (1991) Extracellular Sequestration and Release of Fibroblast Growth Factor: a Regulatory Mechanism? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 268-271.
- Vlodavsky, I.; Folkman, J.; Sullivan, R.; Freidman, R.; Ishai-Michaeli, R.; Sasse, J. & Klagsbrun, M. (1987) Endothelial Cell-derived basic Fibroblast Growth Factor: Synthesis and Deposition into Subendothelial Extracellular Matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2292-2296.
- Wang, F.; Kan, M.; Xu, J.; Yan, G. & McKeegan, W. (1995) Ligand-specific Structural Domains in the Fibroblast Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 10222-10230.
- Williams, A.F. & Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 381-405.
- Yayon, A.; Aviezer, D.; Safran, M.; Gross, J. L.; Heldman, 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. Aca. Sci. USA* **90**, 10643-10647.
- Yayon, A.; Klagsbrun, M.; Esko, J. D.; Leder, P. & Ornitz, D. M. (1991) Cell Surface, Heparin-like Molecules are Required for Binding of basic Fibroblast Growth Factor to its High Affinity Receptor. *Cell* **64**, 841-848.



- Zhan, X.; Bates, B.; Hu, X. & Goldfarb, M. (1988) The Human FGF-5 Oncogene Encodes a Novel Protein Related to Fibroblast Growth Factors. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3487-3495.
- Zhang, J.; Cousens, L. S.; Barr, P. & Sprang, S. R. (1991) Three-dimensional Structure of Human Basic Fibroblast Growth Factor, a Structural Homolog of Interleukin 1 $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3446-3450.
- Zhu, Z.; Komiya, H.; Chirino, A.; Faham, S.; Fox, G. M.; Arakawa, T.; Hsu, B. T. & Rees, D. C. (1991) Three-dimensional Structures of acidic and basic Fibroblast Growth Factors. *Science* **251**, 90-93.

## OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)  
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO