

2.08.01 - Bioquímica / Química de Macromoléculas

## **SÍNTESE DE SULFOPEPTÍDEOS CORRESPONDENTES À REGIÃO N-TERMINAL DOS RECEPTORES CXCR4 E CCR6 E A CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE SEUS LIGANTES FISIOLÓGICOS, AS QUIMIOCINAS CXCL12 E CCL20**

Marlon Lemos Dias<sup>1</sup>, Ana Paula Valente<sup>2</sup>, Viviane Silva de Paula<sup>3</sup>

1- Aluno de IC do Campus Xerém da Universidade Federal do Rio de Janeiro

2- Pesquisadora do IBqM- UFRJ

3- Professora do Campus Xerém da UFRJ e pesquisadora no CNRMN-IBqM

### **Resumo**

As quimiocinas são proteínas solúveis que executam funções quimiotáticas importantes e que possuem receptores específicos acoplados a proteína G. Estes, possuem sete domínios transmembranares e uma região N-terminal voltada para o exterior celular contendo resíduos de tirosina sulfatados que apresentam papel importante na interação, afinidade e seletividade às quimiocinas. Objetivamos o estudo de sulfopeptídeos que correspondem a região N-terminal dos receptores CCR6 e CXCR4 e a caracterização da interação entre as quimiocinas CCL20 e CXCL12 através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Através de síntese química em fase sólida obtivemos 3 peptídeos que correspondem a região N-terminal do receptor CCR6, e 1 correspondente ao receptor CXCR4, além disso, os mesmos foram analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF e ESI e através de espectros de RMN 1D e 2D TOCSY. Nas próximas etapas, iremos expressar a proteína CCL20 e executar estudos de interação por RMN.

### **Palavras chaves:**

Quimiocinas; RMN; Receptor de quimiocina

### **Apoio financeiro:**

FAPERJ; CNPQ

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFRJ**

### **Introdução**

Quimiocinas compreendem uma superfamília de citocinas quimiotáticas na qual interagem com seus receptores acoplados a proteína G (GPCR). Estas interações regulam múltiplas funções fisiológicas. No entanto, a regulação inapropriada destas proteínas está associada a um número extraordinário de desordens fisiopatológicas. Assim, existe um interesse significativo na compreensão de como esses receptores funcionam de forma a desenvolver drogas para bloquear a sua atividade. A sulfatação de tirosinas é uma modificação pós-traducional de proteínas transmembranares, incluindo muitos GPCRs, tais como receptores de quimiocinas. A maioria dos receptores de quimiocinas contém vários resíduos de tirosina sulfatados nas suas regiões N-terminais extracelulares, o local de ligação para as quimiocinas. A sulfatação destes receptores está relacionada diretamente com a interação, afinidade e seletividade às quimiocinas. Neste trabalho, temos como objetivo a síntese de sulfopeptídeos correspondentes a região N terminal dos receptores de quimiocina, CCL20 e CXCR4 e a caracterização da interação dos mesmos com seus ligantes fisiológicos, as quimiocinas CCL20 e CXCL12 por RMN. Estes resultados permitirão investigar a base estrutural pelo qual a

sulfatação de tirosinas modula a atividade do receptor CCR6 e as consequências biológicas desta modulação funcional. Utilizando a estratégia de síntese de peptídeos para explorar o papel da sulfatação de tirosinas no reconhecimento da quimiocina CCL20 pelo seu receptor CCR6, sintetizaremos curtos peptídeos contendo os três sítios putativos de sulfatação nas posições Tyr18, Tyr26 e Tyr27, assumindo que a sulfatação deste peptídeo em uma, duas ou em todas as posições aumentaria substancialmente a afinidade da ligação com a quimiocina. Para testar esta hipótese, sintetizaremos cinco peptídeos, contendo 15 aminoácidos cada, correspondentes aos resíduos 16-30 do CCR6. Além da síntese de sulfopeptídeos, objetivamos purificá-los através de RP-HPLC, caracterizar os peptídeos por espectrometria de massas e estudar a interação da quimiocina CCL20 com o receptor CCR6 por RMN. O objetivo de se sintetizar sulfopeptídeos correspondentes à região N terminal do receptor CXCR4 está em buscar entender como ocorre a interação do receptor pelo seu ligante fisiológico, a quimiocina CXCL12. Para entender como ocorre esse processo serão realizados estudos de interação com os sulfopeptídeos sintetizados e a quimiocina CXCL12 marcada com <sup>15</sup>N por RMN.

### **Metodologia**

Os sulfopeptídeos foram sintetizados por meio da síntese em fase sólida realizada no sintetizador Focus XC Solid Phase Peptide Synthesizer localizado na Cidade Universitária, seguindo os procedimentos de síntese descritos por Volkman et. al.2013. Até o presente momento foram sintetizados os seguintes peptídeos: 1- peptídeo CCR6 não sulfatado; 2- peptídeo CCR6 com o resíduo de tirosina 27 sulfatado; 3- peptídeo CCR6 “small” com resíduo de

tirosina 27 sulfatado e 4- peptídeo CXCR4 com o resíduo de tirosina 21 sulfatado.

O receptor CCR6 contém 3 resíduos de tirosina (Tyr18, Tyr26 e Tyr27) localizados no N terminal capazes de serem sulfatados. Optamos por trabalhar com uma curta sequência correspondente a região N terminal do receptor CCR6 composta por 15 aminoácidos

(<sub>16</sub>EDYFVSVNTSYYSVD<sub>30</sub>) que tem massa molecular de 1787,8 Da. Esta sequência apresenta 3 resíduos de tirosina, alvos de estudo deste trabalho.

Os procedimentos de síntese do sulfopeptídeo correspondente a região N-terminal do receptor CXCR4 foram baseados no trabalho de Volkman et. al.2013. A sequência correspondente a uma pequena região N-terminal do CXCR4 sintetizada apresenta 7 aminoácidos em sua composição (<sub>18</sub>SGDSYDSM<sub>24</sub>), com a tirosina de posição 21 sulfatada e massa molecular de 925,3 Da. Inicialmente, o heptapeptídeo foi sintetizado para a execução de testes de clivagem, visto que, o TFA exerce uma importante função no processo de clivagem do peptídeo da resina. Para isso foram realizados dois testes de clivagem alternando a concentração de TFA em 80% e 90%. Para a produção destes sulfopeptídeos utilizamos uma sufotirosina protegida com um grupamento protetor chamado de Neo pentyl. Essa proteção do grupamento sulfato que é lábil, é importantíssima para impedir que o grupamento sulfato seja removido na etapa de clivagem, realizada com uma solução composta por 90% TFA, 5% TIS e 5% de água. A etapa de clivagem é a etapa que sucede a síntese e é realizada para remoção do peptídeo da resina que funciona como suporte durante a síntese. Para confirmar o sucesso da síntese dos peptídeos, os sulfopeptídeos foram purificados antes e após a remoção do grupo

protetor Neo pentyl que protege o aminoácido tirosina. Esta etapa de purificação é realizada no Campus Xerém da UFRJ. Após sintetizados, os peptídeos são purificados por cromatografia líquida em coluna de fase reversa C8 (Hamilton). Para peptídeos sulfatados utiliza-se um gradiente de 0,1M de acetato de amônio e 100% de acetonitrila. Para peptídeos não sulfatados utiliza-se como fase móvel um gradiente de 0,1% de TFA e 100% de acetonitrila. Após a etapa de purificação dos peptídeos, as amostras são enviadas para o CEMBIO localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Cidade Universitária, onde são analisadas por Espectrometria de massas. Depois de confirmada a massa esperada dos peptídeos, as amostras são analisadas por estudos de RMN no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear.

### **Resultados e Discussão**

O peptídeo CCR6 não sulfatado foi o primeiro a ser sintetizado e com o objetivo de saber se a sulfatação nos resíduos de tirosina é ou não importante para a afinidade, interação e ligação da quimiocina com seu receptor. O cromatograma obtido na purificação indicou que a síntese do peptídeo havia dado certo pela obtenção de um único pico majoritário com tempo de eluição de aproximadamente 22 minutos. Confirmou-se a massa molecular esperada através da análise MALDI TOF. O peptídeo CCR6 com a tirosina 27 sulfatada também foi obtido com sucesso, e sua massa molecular confirmada através da espectrometria de massas. Esses dois peptídeos também foram analisados por RMN. Experimentos em uma e em duas dimensões foram realizados e os resultados obtidos confirmam espectros comuns de peptídeos. Os estudos de interação por RMN serão realizados após a expressão e obtenção da quimiocina CCL20.

Recentemente, em busca de se obter maiores rendimentos durante as sínteses dos sulfopeptídeos e também devido a grande dificuldade em se obter sulfopeptídeos, optamos por trabalhar com uma sequência encurtada, na qual chamamos de “small” com apenas 7 aminoácidos em sua composição e com a tirosina de posição 27 sulfatada. Dentre todos os resultados obtidos durante o projeto, este peptídeo foi o que mais mostrou excelentes resultados. No presente momento, aguardamos a produção e expressão da quimiocina CCL20 para a execução dos estudos de interação. O peptídeo CXCR4 também foi obtido com sucesso, contudo, novas sínteses serão realizadas para aumentar o rendimento.

### **Conclusões**

Frente a grande dificuldade de se obter sulfopeptídeos, no presente trabalho, foi possível obter os peptídeos correspondentes a região N-terminal dos receptores CCR6 e CXCR4. Até o presente momento, o peptídeo correspondente a região N terminal do receptor CCR6 com 7 aminoácidos em sua composição e tirosina de posição 27 sulfatada foi o que melhor obtivemos bom rendimento e o que melhor obtivemos bons resultados. A quimiocina marcada com <sup>15</sup>N que será utilizada para realizar os experimentos de interação com o peptídeo CCR6 está sendo expressa em nosso laboratório e caminha com bons resultados. Os últimos procedimentos de análise de massa por espectrometria de massas do peptídeo CXCR4 estão em andamento e após o recebimento dos resultados, seguiremos para as análises estruturais, estudos de interação e de dinâmica molecular por RMN.

## Referências Bibliográficas

-Sulfopeptide probes of the CXCR4/CXCL12 interface reveal oligomer-specific contacts and chemokine allostery. Ziarek JJ, Getschman AE, Butler SJ, Taleski D, Stephens B, Kufareva I, Handel TM, Payne RJ, Volkman BF. ACS Chem Biol. 2013 8:1955-63

- Regulation of Chemokine Recognition by Site-Specific Tyrosine Sulfation of Receptor Peptides Levi S. Simpson, John Z. Zhu, Theodore S. Widlanski, and Martin J. Stone (2009) Chemistry & Biology 16, 153–161

- De Paula VS, Pomin, VH, Valente AP (2014) J Biol Chem 289: 22969-22979

- De Paula VS, Razzera G, Barreto-Bergter E, Almeida FLC, Valente AP (2011) Structure 19: 26-36

- De Paula VS, Gomes NSF, Lima LG, Miyamoto CA, Monteiro RQ, Almeida FLC, Valente AP (2013) J Mol Biol 4479-4495

- Dosset P, Hus JC, Blackledge M, Marion D (2000) J Biomol NMR 16: 23-28

- James L.C., and Tawfik D.S. (2003) Trends Biochem. Sci. 28, 361-368