

PEPTÍDEOS CÍCLICOS DE BIOMASSA VEGETAL: CARACTERÍSTICAS, DIVERSIDADE, BIOSÍNTESE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Douglas Gatte Picchi, Wanessa Fernanda Alteí, Mônica Sue Saito, Vanderlan da Silva Bolzani* e Eduardo Maffud Cilli
Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", CP 355, 14801-970 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 7/4/08; aceito em 23/9/08; publicado na web em 30/4/09

CYCLIC PEPTIDE FROM PLANT BIOMASS: CHEMICAL FEATURES AND DIVERSITY, BIOSYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES. Natural peptides are outstanding as the most promising macromolecules in the search for new drugs, especially those of cyclic nature. The higher plants revealed a very peculiar composition of their cyclic peptides, which distinguish themselves by a "head-to-tail" cyclization. It is possible to define two groups of cyclic peptides from plant biomass. Those called in this review as Eucyclopeptides formed by 2-12 amino acid, and Cyclotides considered as circular polypeptides, composed of 29-37 amino acid that retain three disulfides bridges in an arrangement known as cyclic cystine knot. Searching for plant peptides should form into a subject for scientific research in the forefront of great importance for bioprospecting natural products macromolecular.

Keywords: cyclic peptides; eucyclopeptides; cyclotides.

INTRODUÇÃO

"Para todos os alvos moleculares importantes no corpo humano existem compostos naturais em outras espécies e em mais de uma em especial". Com essa afirmação Tulp & Bohlin propõem um apropriado paradigma para a química de produtos naturais e para a farmacologia.¹ Esses autores reconhecem que a validade desta citação depende do conhecimento dos mecanismos e funções moleculares e da especificidade de cada receptor biológico, além da elucidação de todos os produtos naturais existentes. Embora a proposta possa parecer ousada, não encontrou muita resistência da comunidade científica.^{2,3} Talvez o principal alicerce desse novo paradigma seja a similaridade genética entre as espécies. Nosso código genético armazena cerca de 30.000 genes, dos quais 289 foram relacionados à doenças humanas. Surpreendentemente, quase a metade desses genes (ligados à doenças) tem um correspondente em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.⁴

Com as descobertas do código genético humano além de outros organismos e os últimos desenvolvimentos sobre os estudos "-oma" (genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma) e tudo que diz respeito às reações bioquímicas responsáveis pela complexidade celular, as substâncias proteicas tornaram-se objeto de pesquisa multidisciplinar envolvendo química e biologia, principalmente. Dessa forma, discute-se cada vez mais a aplicação das ferramentas da biologia molecular na química de produtos naturais, onde o escopo principal pode ser proteínas e peptídeos.⁵ Acredita-se que na era pós-genômica a quimio-genômica será uma alternativa eficiente na busca de fármacos para o tratamento de doenças de origem genética e também de medicamentos com ação direta em determinados receptores celulares.

Nesse contexto, os peptídeos de origem natural destacam-se como macromoléculas promissoras na busca de novos fármacos, especialmente os de natureza cíclica. Nos últimos anos as descobertas de peptídeos bioativos cresceram de forma exponencial. Newmann *et al.* revelam que de um total de 868 de fármacos indicados para uso médico entre 1981-2001, apenas 91 eram compostos macromoleculares, proteínas e peptídeos de origem biológica.⁶ Embora essas pesquisas tenham assumido uma nova conceituação científica, inúmeros

peptídeos descobertos há décadas já apresentavam atividade biológica. Vários fármacos antifúngicos, antibacterianos e antiinflamatórios usados na medicina contemporânea são peptídeos bioativos; inúmeros outros desempenham funções hormonais e sinalizadores neuronais (neurotransmissores), principalmente aqueles encontrados em vertebrados. O grande número de novos peptídeos isolados de várias matrizes revela uma extensa variedade de tipos estruturais e de atividades biológicas (ver itens seguintes). Pesquisas bioguiadas objetivando inibidores de proteases, imunossupressores, antimicrobianos e anticancerígenos, entre outros, revelam um número crescente de estruturas peptídicas biologicamente ativas.

Além das atividades terapêuticas atribuídas aos peptídeos e polipeptídeos, estas moléculas desempenham papel importante nos processos de defesa de animais, microrganismos e plantas. Isso demonstra uma relação evolutiva deveras interessante, considerando que plantas, animais e microrganismos tiveram histórias evolutivas distintas, mesmo apresentando a mesma origem (teoria heterotrófica - todos os organismos derivam de uma mesma proteína ancestral). Pode-se evidenciar esta origem comum a partir dos mecanismos de defesa empregado pelos organismos, pois foi constatado que plantas e animais possuem mecanismo molecular comum nos processos de imunidade inata.⁷ Neste elenco de semelhanças podemos acrescentar os receptores moleculares de sinais de ativação para a transcrição de certos genes.

Embora os estudos sobre funções e propriedades farmacológicas de peptídeos de origem animal e microbiana sejam expressivos, os peptídeos de origem vegetal ainda são pouco estudados. No Brasil, os primeiros trabalhos com peptídeos cíclicos de origem vegetal começaram a ser desenvolvidos recentemente. Deste modo, a busca por peptídeos vegetais deve constituir-se em um tema de investigação científica de vanguarda e de grande relevância para pesquisas de bioprospecção de produtos naturais macromoleculares.

PEPTÍDEOS EM PLANTAS SUPERIORES

Como em um laboratório sofisticado, as plantas são capazes de produzirem centenas de micromoléculas de natureza química complexa, pertencente às mais variadas classes. Estas substâncias, sem dúvida, não só inspiraram e motivaram o desenvolvimento da síntese orgânica moderna, como são responsáveis por um magnífico

*e-mail: bolzaniv@iq.unesp.br

número de produtos farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos, sejam produtos isolados ou sintéticos.⁶

Há pouco tempo evidenciou-se que plantas superiores acumulam certos tipos de peptídeos e, para alguns destes já foram definidos seus papéis biológicos. Peptídeos antimicrobianos são encontrados em plantas como um elemento vital em seus processos de imunidade.^{7,8} Assim como os animais, as plantas usam sinalizadores moleculares como um modo de comunicação intercelular (hormônios), tais como auxina, citocinina, giberilina, etileno, ácido abscísico e brassinosteróides. Entretanto, em 1991 foi isolado por Pearce e colaboradores o primeiro peptídeo hormonal em vegetais, a sistemina.⁹

Inicialmente isolada das folhas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae), a sistemina é um polipeptídeo com 18 resíduos de aminoácidos ativo em concentração muito baixa (femtomolar). Para Lindsey *et al.*, esse hormônio-peptídeo age na via sinalizadora octadecanóide que gera ácido jasmônico, um sinalizador chave para desencadear o processo genético de defesa.¹⁰ Quando uma folha é ferida por herbivoria ou mecanicamente, os genes codificadores de sistemina são expressos, transcritos e rapidamente transportados via floema para outras partes da planta ainda intactas. De acordo com Matsubayashi e Sakagami a sistemina atua sobre a *mitogen activated protein* - MAP - cinase levando à ativação da fosfolipase e conseqüente liberação do ácido linoléico das membranas e aleno óxido-ciclase que gera o intermediário do ácido jasmônico, o ácido 12-oxo-fitodienóico - OPDA. Estes eventos culminam no aumento da produção de ácido jasmônico que regula, via *feedback* positivo, a expressão gênica da prosistemina. O ácido jasmônico produzido move-se através do sistema vascular onde alcança folhas intactas, desencadeando o processo de defesa no vegetal provocando a inibição da herbivoria.¹¹

Em *Lycopersicon esculentum* Mill., a sistemina é a princípio transcrita como um pró-hormônio de 200 resíduos de aminoácidos. Nas folhas de tabaco *Nicotiana tabacum* L. foi identificado um propeptídeo de 165 resíduos com dois domínios de 18 resíduos cada (Tob Sys I e Tob Sys II) que conservam a mesma função da sistemina do tomate (Figura 1).¹²

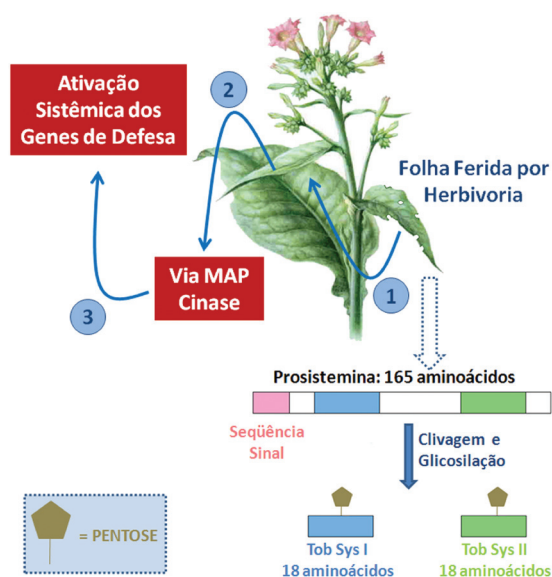


Figura 1. Modelo de resposta a ferida sistêmica em tabaco. Após a ferida, um pró-hormônio secretado, contendo uma porção sinal amino terminal e dois domínios análogos, é clivado em Tob Sys I e Tob Sys II, os quais são translocados para partes intactas (1), agindo na via sinalizadora MAP cinase (2) que ativa a transcrição dos genes de defesa (3) inibindo a herbivoria. Modificado a partir da ref. 12

Embora semelhantes no comprimento da cadeia polipeptídica, há muito pouca homologia entre eles. Análise por espectrometria de massas desses dois hormônios indicou a presença de pentoses ancoradas na cadeia peptídica que são liberadas em condições brandas de hidrólise, enquanto que a sistemina de tomate não apresenta tal padrão de glicosilação. Lindsey argumenta que os açúcares presentes na estrutura de Tob Sys I e Tob Sys II são importantes para a atividade destes, mas que sua presença não é essencial.¹² Outros peptídeos foram encontrados nas plantas superiores onde desempenham funções hormonais (Tabela 1).

Tabela 1. Peptídeos vegetais com funções sinalizadoras

Peptídeo	Resíduos	Função biológica	Ref.
Sistemina	18	Desencadeia os mecanismos de defesa em plantas feridas.	13
Clavata 1 e 3	18	Controlam a organização dos meristemas apicais.	14
Fitosulfocina	5	Regula a divisão e diferenciação celular (atividade mitogênica).	15
Enod 40	13-27	Induz a nodulação da raiz próxima ao sítio de infecção por <i>Rhizobium</i> ; promove a divisão das células corticais da raiz.	16
Polaris	36	É expressa em resposta à informação posicional; regula o crescimento da raiz.	17
SCR (SP11)	74-77	Impede a polinização cruzada interespecíes; sinaliza a auto-compatibilidade do grão-de-pólen com a papila estigmatal.	18
IDA (gene)	77	Controle do processo de abscisão floral.	19
DVL	51	Controla a proliferação celular no eixo longitudinal de folhas, pecíolos e alguns frutos.	20
ROT4	53	Controla a proliferação celular no eixo longitudinal de folhas e órgãos florais.	21

Peptídeos com cadeias lineares exibem características físico-químicas muito distintas quando comparados com os seus análogos ciclizados. Bogdanowich-Knipp *et al.* mostraram que o peptídeo cíclico RGD (Arg-Gly-Asp) é mais estável na faixa de pH entre 3-7 que seu análogo linear.²² Diferente dos peptídeos de cadeia aberta que apresentam livre rotação em torno da ligação amídica, os peptídeos cíclicos são rígidos e estáveis, tanto a degradação térmica quanto a enzimática.²³ A ciclização pode reduzir a flexibilidade de peptídeos e proteínas, o que confere a esses compostos uma maior afinidade na ligação com receptores,²⁴ e podem eliminar as extremidades N- e C- terminal que atuam como pontos de reconhecimento para o ataque de enzimas proteolíticas.^{25,26} De fato, os fármacos desenvolvidos a partir de peptídeos lineares requerem em suas formulações, inibidores de proteases ou então modificações na composição de aminoácidos a fim de não serem reconhecidos por estas enzimas.⁸ Tais características sustentam a hipótese de que a dimensão da degradação desses compostos é dependente do grau de flexibilidade inerente à sua estrutura.

O comportamento dos peptídeos frente a membranas biológicas também varia bastante, dado constatado pela avaliação da permea-

bilidade da **encefalina** – peptídeo opioídeo cíclico – e seu análogo acíclico. Estes resultados revelaram que a forma linear é cerca de 6 vezes mais permeável, pois sua maior liberdade conformacional possibilita a interação com a membrana e seu transporte através desta. Esses liberam mais facilmente a água de hidratação e com isso, requerem menos energia livre para permearem por membrana. A interação de um peptídeo linear com a membrana é um processo exotérmico guiado pela entalpia do sistema, onde a mudança conformacional do peptídeo permite a interação lipídeo-peptídeo. Já para os peptídeos cíclicos (análogos), essa interação com a membrana é um processo entropicamente guiado e controlado pela ressolvatação do peptídeo conformacionalmente restrito.²⁷

Os procedimentos de isolamento dos peptídeos vegetais são muito diferentes dos empregados para outras matrizes biológicas, pois a biomassa vegetal é complexa, composta por muitas outras classes de substâncias (pigmentos, açúcares, gorduras, taninos etc). Para Claeson *et al.* existem três razões para se intensificarem estudos sobre procedimentos de extração e purificação de peptídeos de biomassa vegetal: as plantas acumulam peptídeos únicos e de reconhecido interesse farmacológico; usam peptídeos como moléculas sinalizadoras; as ferramentas da biologia molecular são disponíveis para manipulação desses compostos.²⁸

Poucos peptídeos de natureza cíclica em plantas superiores são descritos na literatura, sendo numerosos os já descritos para animais e microrganismos. Algumas famílias de angiospermas se destacam por acumularem tais peptídeos como: Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae e Violaceae. Provavelmente, devido às crescentes publicações sobre essa temática, uma grande variedade estrutural e funcional de peptídeos vegetais cíclicos serão evidenciadas em pouco tempo.

DIVERSIDADE QUÍMICA E SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO

O desenvolvimento crescente das pesquisas com peptídeos vegetais cíclicos demonstram a grande diversidade estrutural dessa classe, principalmente no cerne da estrutura terciária, quando presente. A complexidade exige níveis de classificação e nomenclatura adequadas para subdividir os peptídeos de acordo com as características estruturais, biossintéticas e conformacionais. As plantas superiores revelaram uma composição muito peculiar de seus peptídeos cíclicos e lineares. Desta forma, estabelecer parâmetros para classificar essas macromoléculas torna-se imperativo, dado o número de peptídeos cíclicos descritos dentro da taxonomia de peptídeos vegetais.

A primeira tentativa de se uniformizar a classificação dos peptídeos vegetais foi feita por Zhou & Tan, pois até então a literatura tratava esses compostos isoladamente, como peptídeos alcaloídicos, depsiciclopeptídeos e ciclopeptídeos.²⁹ No entanto, o esquema proposto revela uma evidente ausência de dados taxonômicos tornando esta classificação difícil de ser compreendida (Figura 2). Além disso, esse esquema primário foi posteriormente revisto pelos mesmos autores a fim de contemplar compostos, que de início foram excluídos da proposta original resultando na completa revisão sobre compostos peptídicos de natureza cíclica.³⁰ Esses autores compilaram todos os dados descritos após o ciclolinopeptídeo A.³¹

Com isso, essa revisão agrupou 455 compostos isolados de 120 espécies distribuídas em 26 famílias botânicas distintas. Tal variedade numérica revelou uma ampla diversidade estrutural que foi organizada por esses autores em oito grupos: ciclopeptídeos alcaloídicos, depsiciclopeptídeos, ciclopeptídeos tipo-Solanaceae, tipo-Urticaceae, tipo-Compositae, tipo-Rubiaceae, tipo-Caryophyllaceae e os Ciclotídeos (Figura 3).

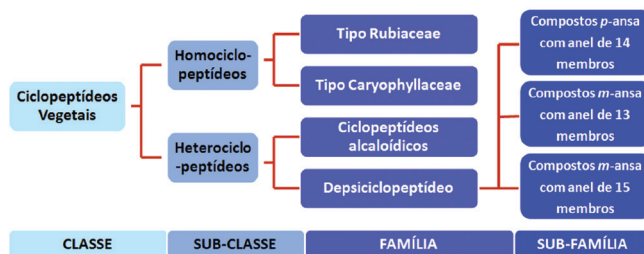


Figura 2. Níveis taxonômicos atribuídos de acordo com o delineamento de cada grupo; esquema de classificação dos peptídeos vegetais de natureza cíclica proposto por Zhou e Tan²⁹

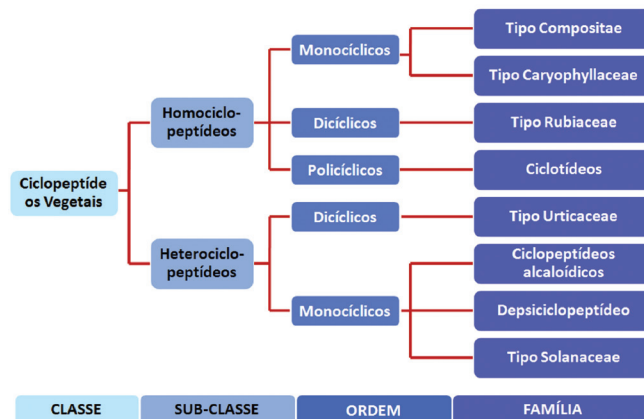


Figura 3. Níveis taxonômicos atribuídos de acordo com o delineamento de cada grupo; esquema de classificação dos peptídeos vegetais de natureza cíclica proposto por Zhou e Tan³⁰

Dois dados apresentados nessa nova proposta devem ser discutidos. O primeiro e mais evidente, é não incluir em seu quadro geral os peptídeos de natureza linear, que embora não sejam tão abundantes ou extensivamente estudados, desempenham papel chave nos processos de regulação do crescimento e desenvolvimento de um vegetal. O segundo e talvez o mais grave seja o uso inapropriado de uma nomenclatura baseada nas famílias botânicas, levando a uma generalização e a inferências pouco elucidativas quanto à filogenia dos grupos taxonômicos referenciados.

Nomear um grupo, por exemplo, como “Tipo Rubiaceae” leva a concluir que todos os peptídeos descritos nessa família botânica ocorrem exclusivamente nesse taxon. No entanto, existem peptídeos cíclicos de Rubiaceae que não se enquadram nas características delimitadas para este tipo, como o caso da palicoureína (*Palicourea condensata* Standl.) e kalata B1 (*Oldenlandia affinis* (Roem. & Schult.) DC.). Na verdade, Craik *et al.* denominaram esses dois peptídeos cíclicos e alguns outros como ciclotídeos, evidenciando uma família de peptídeos de 29-37 resíduos de aminoácidos encerrados na estrutura cíclica “cabeça-cauda” e com três ligações dissulfeto.³²

Além disso, foram isolados de biomassa vegetal outros compostos protéicos cuja natureza cíclica é mantida por meio de ligações dissulfeto, mas que apresentam extremidades N- e C- livres. Esta característica estrutural difere das já descritas para os peptídeos vegetais devendo, portanto, serem incluídos numa nova classe. Os peptídeos antifúngicos EAFP1 e EAFP2 isolados de *Eucommia ulmoides* Oliv. (Eucommiaceae) são exemplos deste tipo estrutural contendo 41 resíduos de aminoácidos em uma cadeia cíclica, mantida por cinco ligações dissulfeto com padrão de conectividade complexa e única.³³ Outros dois exemplos vêm de duas espécies de Moraceae, das quais

foram isolados peptídeos capazes de se ligar às proteínas virais gp41 e gp120 impedindo a infecção da célula hospedeira, sendo um fármaco anti-HIV.³⁴ Contrajervina, um peptídeo de 46 resíduos de aminoácidos isolado de *Dorstenia contrajerva* L. tem sua natureza cíclica mantida por oito ligações dissulfeto, enquanto que a treclavirina, isolada de *Treulia obovoidea* N. E. Br. apresenta estrutura dimérica, onde cada monômero é formado por uma cadeia polipeptídica de 50 resíduos de aminoácidos sendo que vinte são resíduos de cisteína envolvidos na formação de dez ligações dissulfeto. Desta forma, a natureza dimérica de treclavirina é mantida por, pelo menos, uma ligação dissulfeto entre os monômeros.³⁴

O caso mais interessante é o dos peptídeos inibidores de tripsina MCoTI-I e MCoTI-II, isolados de *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. (Cucurbitaceae).^{35,36} Esses peptídeos estão agrupados aos ciclotídeos, mas algumas evidências estruturais tornam essa abordagem contraditória, gerando discussões sobre esta classificação. Peptídeos inibidores de tripsina e sua correlação com os ciclotídeos serão discutidos adiante em maiores detalhes. A adoção de critérios químicos e filogenéticos adequados tornaria o sistema de classificação de peptídeos menos sujeito a equívocos.

Laskowski & Kato sugeriram que para os peptídeos inibidores de proteases fossem usados parâmetros como a homologia das estruturas primárias, a localização do sítio ativo e o padrão de conectividade das ligações dissulfeto (*cystine knot*) para classificar famílias distintas de inibidores de proteases.³⁷ Tradicionalmente, a química de produtos naturais há muito percebeu que um parâmetro adequado e real para classificação dos milhares de compostos isolados de fontes biológicas é a informação sobre suas biossínteses. De fato, dados sobre as rotas biossintéticas dos produtos naturais tornam a classificação mais próxima da organização natural. Entretanto, poucas informações sobre a biossíntese da maior parte desses peptídeos de origem vegetal estão descritas na literatura.

Nessa revisão consideraremos somente os peptídeos que retêm em sua estrutura, somente resíduos de aminoácidos (proteinogênicos ou não-proteinogênicos) e, cuja estrutura cíclica é mantida pela formação de uma ligação peptídica entre o grupo α -amino terminal com o grupo γ -carboxila terminal.³⁰ Esse modo de ciclização é chamado “cabeça-cauda”, diferente de muitos peptídeos de natureza cíclica encontrados em animais, microrganismos e até mesmo em muitos vegetais. Como resultado dessa restrição, apenas dois grupos de peptídeos descritos na revisão publicada por Tan & Zhou serão apresentados: os ciclotídeos e os ciclopeptídeos tipo-Caryophyllaceae.³⁰ Esses últimos denominados por nós como euciclopeptídeos.

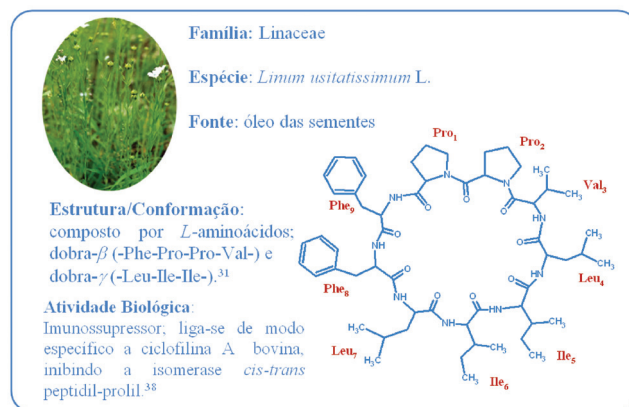
Potencial biológico de euciclopeptídeos: peptídeos constituídos por ciclos de 2-12 resíduos de aminoácidos

O primeiro euciclopeptídeo descrito na literatura foi o ciclinopeptídeo A, um nonapeptídeo isolado das sementes de *Linum usitatissimum* L. (Linaceae) em 1959 e que apresenta atividade imunossupressora (Quadro 1).^{31,38} Assim como o ciclinopeptídeo A, muitos outros incluídos nesta classe foram isolados de biomassa vegetal e apresentam importantes atividades farmacológicas. Podemos defini-los como compostos peptídicos ciclizados via “cabeça-cauda” formados por 2-12 resíduos de aminoácidos. Aparentemente, os euciclopeptídeos encerram em sua estrutura apenas α -aminoácidos, os quais podem sofrer modificações (metilação, hidroxilação e epimerização) ao longo da via biossintética. No entanto, o completo desconhecimento da biossíntese desses compostos é um complicador para as tentativas de classificação dos peptídeos cíclicos vegetais e também para estudos de manipulação genética.

De acordo com a revisão de Tan & Zhou esses peptídeos cíclicos são denominados “tipo-Caryophyllaceae” e os autores identificaram

168 compostos pertencentes a esse grupo.³⁰ Considerando as interregimidas isoladas posteriormente e o peptídeo bioboleína não incluído na revisão, o número descrito é, na verdade, 171 euciclopeptídeos.³⁰ Desse total, 51,5% (88) estão distribuídos na família Caryophyllaceae, 12,3% (21) na família Annonaceae, 10,5% (18) na família Euphorbiaceae e os 25,7% restantes (44) distribuem-se nas famílias Araliaceae, Lamiaceae, Linaceae, Phytolaccaceae, Rutaceae, Schizadraceae e Verbenaceae. As tabelas a seguir mostram somente os compostos que foram encontrados na literatura pelas ferramentas usuais de busca (consulta de acervo bibliográfico e pesquisa na web).

Quadro 1. Ciclinopeptídeo A - o primeiro euciclopeptídeo isolado



A estrutura dos euciclopeptídeos é responsável pela variedade de bioatividades exibidas por esses compostos e pelas propriedades físico-químicas muito peculiares. A análise conformacional de alguns euciclopeptídeos de sete resíduos (heptaciclopeptídeos) mostra que suas estruturas encerram duas dobras- β e, um *bulge*- β onde, no mínimo, um resíduo de prolina está presente.³⁹ Tal estrutura é responsável por conferir uma maior restrição conformacional à molécula, devido às ligações de hidrogênio intramoleculares que estabilizam o anel cíclico.⁴⁰ No entanto, se os prótons amídicos da prolina não estiverem envolvidos na ligação de hidrogênio, o composto pode assumir outras conformações, principalmente decorrente da isomerização *cis-trans* da ligação amídica do resíduo de prolina.⁴¹ Mas a estabilização do anel cíclico pode ser observada mesmo quando o resíduo de prolina está ausente, como no caso da mahafacilina A, o primeiro euciclopeptídeo que exibe um *bulge*- β sem a prolina.⁴² Nesse caso, a ligação de hidrogênio intramolecular ocorre entre a Val⁶-NH e Ile³-CO e entre a Phe⁷-NH e Ile³-CO.

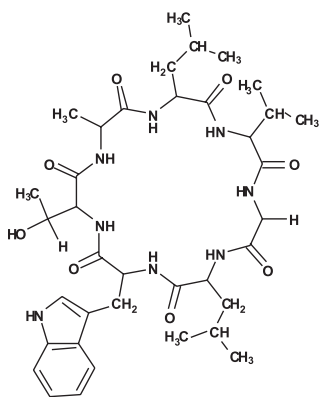
Vários euciclopeptídeos foram submetidos a ensaios biológicos e, alguns resultados foram interessantes, sendo possível se traçar um perfil do potencial desses compostos para o desenvolvimento de novos fármacos (Tabela 2). A maior parte dos euciclopeptídeos testados apresenta ação citotóxica em algumas linhagens de células tumorais como, por exemplo, o glaucaciclopeptídeo A que inibiu o crescimento da cultura de células KB com IC₅₀ de 0,73 μ M.⁴³ Outros como querimolaciclopeptídeo A e B,⁴⁴ diantina E⁴⁵ e segetalina C⁴⁶ também apresentaram ação citotóxica. Os peptídeos isolados de Euphorbiaceae, exclusivamente do gênero *Jatropha*, são notórios pela atividade antiproliferativa do parasita *Plasmodium falciparum*, como por exemplo, quevalierina A,⁴⁷ mahafacilina A⁴² e B⁴⁸ e polianina A, B e C.⁴⁹ Além das atividades citotóxica e antimalárica, outros euciclopeptídeos exibiram atividade inibidora de proteases,⁵⁰⁻⁵² inibidora da ciclooxigenase,^{53,54} imunomodulador,^{55,56} imunossupressor³⁸ e mimético de hormônios estrogênicos⁵⁷ (Figura 4).

A natureza cíclica desses peptídeos apresenta duas importantes características desejadas para um protótipo de fármaco: primeira-

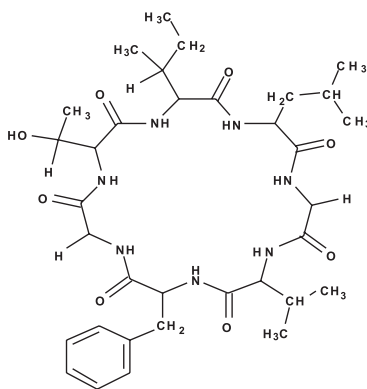
Tabela 2. Atividades biológicas dos euciclopeptídeos

Euciclopeptídeo	Espécie Vegetal	F ¹	aa ²	Massa ³	Atividade	Potência	Ref.
Curcaciclina A	<i>Jatropha curcas</i> L.	E	8	766	Imunomodulador	ND	55
					Inibidor da proliferação de células T humanas	ND	55
Curcaciclina B	<i>Jatropha curcas</i> L.	E	9	863	Ativador da atividade rotamase da ciclofilina A humana	AE 60% (30 µM)	66
Diandrina A	<i>Drymaria diandra</i> Blume	C	5	747	Inibidor da agregação plaquetária	AP 21,5%	67
Diantina E	<i>Dianthus superbus</i> L.	C	7	600	Citotóxico	IC ₅₀ 2,4 µg/mL	45
Dicotomina A-C e E	<i>Stelluria dichotoma</i> L. var. <i>lanceolata</i> Bge.	C	5-6	509-680	Citotóxico	IC ₅₀ 2,0-5,0 µg/mL	53
Dicotomina D e F-G	<i>Stelluria dichotoma</i> L. var. <i>lanceolata</i> Bge.	C	6/9/9	636/1011/1065	Inibidor da COX	AE 62,6-72,6%	53, 54
Glaucaciclopeptídeo A	<i>Annona glauca</i> Thonn. in Schum.	A	7	593	Citotóxico	IC ₅₀ 0,73 µM	43
Integerrimida A-B	<i>Jatropha integerrima</i> Jacq.	E	7/7	780/766	Inibidor do desenvolvimento de células neuronais humanas	IC 50 µM	68
					Antitumoral	IC 50 µM	68
Labaditina e Bioboleína	<i>Jatropha multifida</i> L.	E	10/9	1071/869	Imunomodulador	ND	56
Mahafaciclina A- B	<i>Jatropha mahafalensis</i> Jum. & H. Perrier	E	7/7	687/803	Antimalárico	IC ₅₀ 16-2,2 µM	42, 48
Pohlianina A-C	<i>Jatropha pohliana</i> Müll. Arg.	E	7/7/8	755/769/792	Antimalárico	IC ₅₀ 16-57 µM	49
Pseudoestelarina A-G	<i>Pseudostellaria heterophylla</i> (Miq.) Pax	C	5-9	501-895	Inibidor de tirosinase	IC ₅₀ 50-187 µM	50, 52
Querimolaciclopeptídeo A-F	<i>Annona cherimola</i> Mill.	A	6-9	634-959	Citotóxico	IC ₅₀ 0,017-45 µM	44, 69-71
Quevalierina A	<i>Jatropha chevalieri</i> Beille	E	8	808	Antimalárico	IC ₅₀ 8,9 µM	47
Segetalina G-H	<i>Vaccaria segetalis</i> (Neck.) Garcke ex Asch.	C	5	518/610	Mimético de Estrógeno	2,5 mg/kg	57
Yunanina C	<i>Stellaria yunnanensis</i> Franch	C	7	721		IC ₅₀ 2,2 µg/mL	72

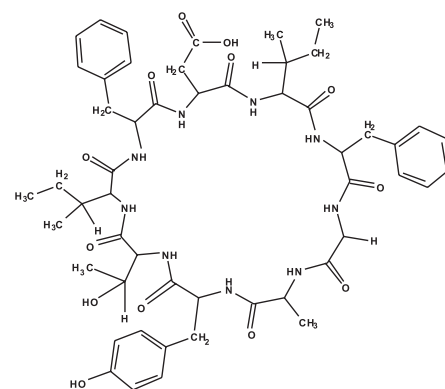
¹ Famílias Botânicas, sendo A - Annonaceae; C - Caryophyllaceae; E - Euphorbiaceae. ²Tamanho da cadeia polipeptídica (nº de resíduos de aminoácidos). ³Massa molecular (Daltons). AP – Agregação plaquetária; AE – Aumento da atividade enzimática; IC₅₀ – Concentração inibitória requerida para inibição de 50% do crescimento de linhagens tumorais; ND – não determinado



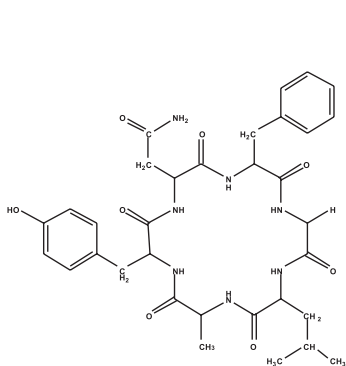
Ciclogossina A⁵⁸
Jatropha gossypifolia L.
(Euphorbiaceae)



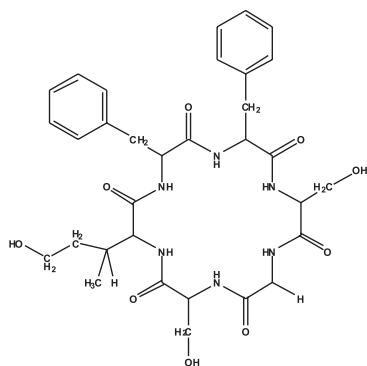
Mahafaciclina A⁴²
Jatropha mahafalensis Jum. & H. Perrier
(Euphorbiaceae)



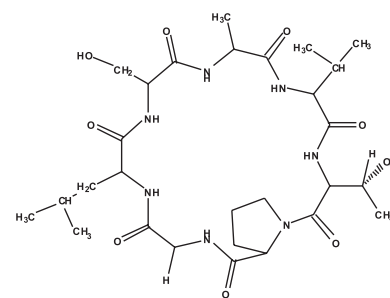
Quevalierina A⁴⁷
Jatropha chevalieri Beille
(Euphorbiaceae)



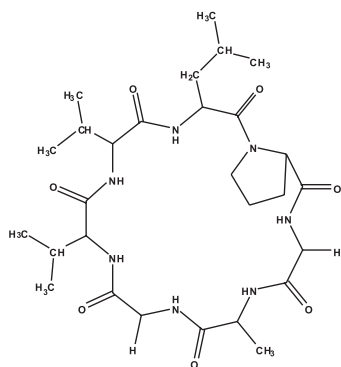
Diantina A⁵⁹
Dianthus superbus L.
(Caryophyllaceae)



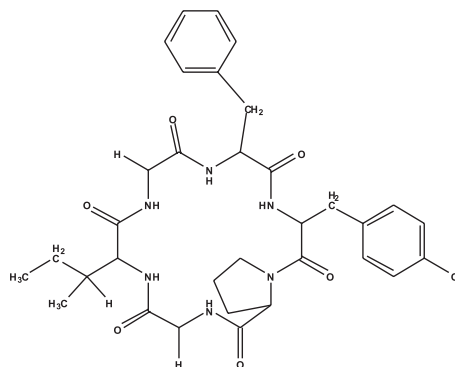
Estelarina C⁶⁰
Stellaria yunnanensis Franch.
(Caryophyllaceae)



Ciclogosenegalina B⁶¹
Annona senegalensis Pers.
(Annonaceae)



Glaucociclopeptídeo A⁴³
Annona glauca Thonn. in Schum.
(Annonaceae)



Querimolaciclopeptídeo E⁶²
Annona cherimola Mill.
(Annonaceae)

Figura 4. Estrutura molecular de alguns euciclopeptídeos bioativos distribuídos em Famílias de Angiospermae

mente as interações ligante-receptor devem ser favorecidas pela estrutura cíclica e, ao mesmo tempo, são mais estáveis à degradação enzimática.⁶³ Peptídeos cíclicos pequenos são amplamente usados como ligantes de receptores e duas abordagens são possíveis para tal propósito. A primeira envolve o *design* de peptídeos cíclicos baseados na estrutura-atividade e na análise conformacional do ligante. A segunda focaliza o receptor, onde a modelagem molecular dos sítios mutantes são usados para o reconhecimento da estrutura do receptor mais adequado. Aliadas, tais abordagens compõem relevante ferramenta para o desenvolvimento racional de fármacos com ação em receptores específicos, como os opióides que servem de alvo para quase 50% dos fármacos analgésicos comercializados.⁶⁴ Przydzial *et al.* em seus trabalhos com tais receptores encontraram que o tetrapeptídeo cíclico Tyr-c[D-Cys-Phe-D-Cys]-NH₂ (ciclização via ligação dissulfeto) exibiu alta afinidade por todos os receptores opióides.⁶⁵

Aspectos sobre a biossíntese dos euciclopeptídeos

Até o momento, não se conhece como os euciclopeptídeos são sintetizados nos vegetais. De fato, a literatura não apresenta nenhuma informação sobre a biossíntese desses compostos, sendo essa temática uma abordagem prioritária para o conhecimento dessa classe, sua importância ecológica e aplicação biotecnológica. Uma racionalização para a compreensão das vias biossintéticas que levam aos euciclopeptídeos pode ser encontrada na elucidação dos passos metabólicos envolvidos na biossíntese de peptídeos cíclicos de origem microbiana como a gramicidina S e tirocidina de bactérias do gênero *Bacillus*, da ciclosporina produzida pelo fungo *Tolypocladium inflatum*⁷³⁻⁷⁶ e da microcistina, nodularina e cilindrospirina biossintetizadas por algas azuis (cianobactérias). É evidente que qualquer inferência feita deve considerar as diferenças no processamento das informações genéticas de cada organismo para a síntese de seus compostos. Entretanto, foi demonstrado que a síntese de peptídeos apresenta diversas similaridades em organismos procariontes e eucariontes.^{77,78} Algumas das características químicas dos euciclopeptídeos, como tamanho da cadeia peptídica, alguns resíduos modificados e sua distribuição nas famílias vegetais, indicam que a sua síntese segue o esquema não-ribossomal, ou seja, ocorre via um complexo multienzimático com domínios distintos para cada resíduo da cadeia peptídica a ser formada.

Síntese não-ribossomal dos euciclopeptídeos

Um vasto número de peptídeos de diferentes tipos é conhecido e suas composições sugerem que não são oriundos de um sistema ribossomal de síntese. Esse sistema não-ribossomal de síntese pode ser visualizado em quase todos os organismos protistas, sendo observado também em alguns eucariotes (algas, plantas e alguns animais). Antes da década de 60 a síntese enzimática de peptídeos como a glutatona e panteteína já era conhecida.⁷⁹

As primeiras tentativas para a elucidação da síntese enzimática de peptídeos foram dadas em 1954 por Frits Lipmann demonstrando que os peptídeos gramicidina S e tirocidina eram sintetizados por um complexo enzimático em que as ligações peptídicas eram formadas por meio de aminoácidos ligados aos grupos tiois da enzima. Com base nas similaridades desse sistema e da via de biossíntese dos ácidos graxos, foi delineado o esquema dessa rota biossintética.⁸⁰⁻⁸² Outra evidência de que a síntese desses compostos não ocorre por meio da via clássica (ribossomal), veio dos estudos com extratos livres de células. Observou-se que, mesmo com a administração de RNAses e inibidores de síntese ribossomal, havia a produção de novos compostos proteicos.⁸³ Ficou evidente que há uma rota enzimática para a síntese de peptídeos e que essa se desenrola através de um

complexo enzimático modular chamado não-ribossomal peptídeo sintetase (NRPS).

Os peptídeos formados pelas NRPS contêm de 3 a 15 aminoácidos e sua diversidade estrutural pode ser até mesmo superior a qualquer possibilidade criada por um sistema ribossomal dependente de ácido nucleico. Essa diversidade é decorrente da incorporação tanto de aminoácidos proteínogênicos quanto de não-proteínogênicos, além de outros blocos construtores não usuais, como -hidróxi-ácidos e carboxi-ácidos.⁸² Até o momento, foram identificados mais de 300 blocos construtores para a biossíntese dos euciclopeptídeos e depsi-peptídeos o que na realidade é uma biblioteca muito mais extensa do que os 20 *L*-aminoácidos essenciais da biossíntese ribossomal.^{78,79}

Desde as primeiras observações de Lipmann, inúmeros outros peptídeos foram associados com esse sistema enzimático complexo, no qual os peptídeos são inicialmente sintetizados como precursores lineares mantidos ligados à NRPS por meio de ligações tioéster. No final do processo de elongação da cadeia peptídica, o produto final pode ser liberado na sua forma linear ou sofrer uma etapa adicional de ciclização.

As NRPS são gigantes complexos enzimáticos que podem chegar até mesmo a massa de 16MDa no caso da ciclosporina sintetase.⁸⁴ A maior parte das NRPS conhecidas para fungos apresentam-se como complexos modulares formados por uma única cadeia polipeptídica (ciclosporina sintetase),⁸⁴ enquanto que aquelas descritas para bactérias e cianobactérias se organizam em pequenas subunidades que interagem entre si, formando uma única NRPS (tirocidina sintetase).⁸²

Os módulos de uma NRPS são pequenas unidades funcionais responsáveis pela introdução de um substrato específico na estrutura do peptídeo. Em suma, cada módulo corresponde a um ciclo completo para a extensão da cadeia peptídica.^{82,85} Dessa forma, cada módulo deve conter um mínimo de sítios catalíticos básicos para que a NRPS desempenhe sua função, onde cada sítio é responsável por uma etapa específica da incorporação do substrato, conhecidos como domínios. Os domínios básicos de um módulo são:

Domínio de Adenilação (Domínio A). Formado por cerca de 550 aminoácidos, responsável pelo reconhecimento de seu substrato e sua consequente ativação com a formação de um aminoacil adenilato.^{78,85}

Domínio de Tioilação (Domínio T ou PCP – *peptidyl carrier protein*). Geralmente constituído por cerca de 80 aminoácidos, o domínio T contém ainda o grupo prostético 4'-fosfopanteteína (4' PP) adicionado pós translacionalmente em um resíduo conservado de serina em cada módulo pela ação da 4'-fosfopantateína transferase.^{78,82}

Domínio de Condensação (Domínio C). Entre os consecutivos domínios A e T de cada módulo há um domínio C que é formado por cerca de 450 aminoácidos. É no domínio C que ocorre a formação da ligação peptídica entre os substratos de módulos adjacentes. Sítios doadores e aceptores no cerne do domínio C são, na verdade, os direcionadores da elongação da cadeia peptídica por meio do ataque nucleofílico do grupo α -amino livre de um substrato no sítio aceptor à ligação tioéster de um substrato vizinho (aminoácido ou peptídeo) no sítio doador.^{78,82}

Todo o processo é energeticamente custoso sendo que nas etapas de adenilação, tioilação e epimerização há o requerimento de ATP. Analogamente a sistemas ribossomais de síntese, a elongação da cadeia ocorre via “crescimento da cabeça” (Figura 5).⁸⁶ O conjunto desses domínios básicos é suficiente para a formação de uma cadeia peptídica que permanece ligada à enzima por meio do último domínio T. Para que o peptídeo seja liberado da enzima, um domínio adicional está presente na porção C-terminal da NRPS. O domínio de tioesterificação ou clivagem (**Domínio TE** ou **CV**) é crucial para a funcionalidade da NRPS e é formado por cerca de 280 aminoácidos.^{78,85} Baseado no ataque nucleofílico de um sítio com serina ao peptidil-

tioéster preso no último domínio T, o peptídeo pode ser liberado ou por hidrólise na forma de um peptídeo linear ou ainda sofrer uma reação intramolecular originando um peptídeo cíclico (Figura 6). O modo de liberação de cada peptídeo depende da organização modular de cada NRPS. No caso de peptídeos cíclicos, nos quais a formação

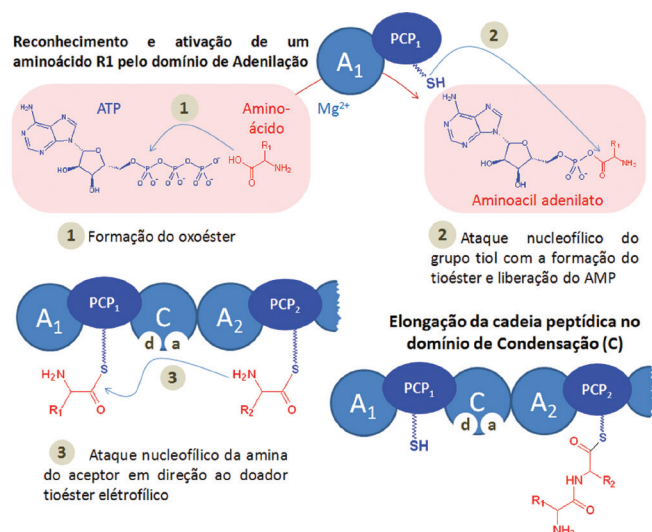


Figura 5. Mecanismo químico envolvido na ativação, tiolação e formação da ligação peptídica de dois módulos iniciais da peptidase sintetase. De início, há a formação do aminoacil adenilato com posterior transferência deste para o grupo sulfidrílico do 4'-fosfopantetino e liberação de AMP. A ligação peptídica ocorre entre dois aminoácidos tioesterificados no domínio de condensação (sítios receptor - a - e doador - d) com resultante formação de um dipeptídeo que permanece ligado ao PCP₂ até o processo de estágio de condensação com o módulo seguinte, enquanto o PCP₁ fica livre para receber outro aminoacil adenilato

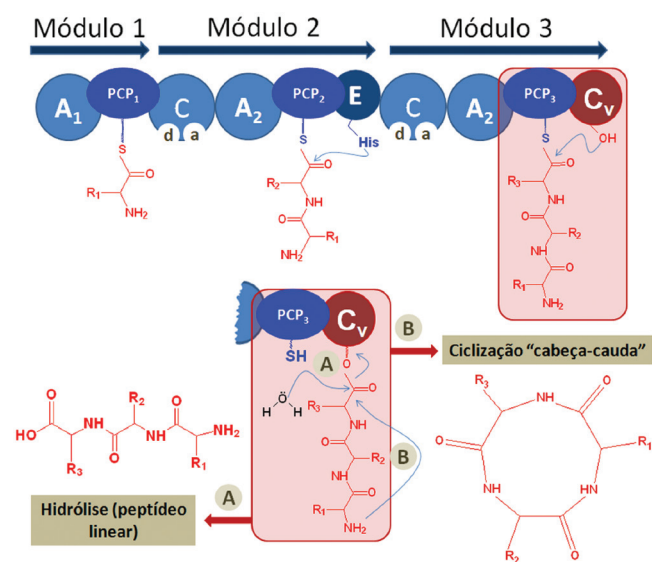


Figura 6. Esquema de uma tripeptidase hipotética. Após o carregamento dos domínios de adenilação com os aminoacil adenilatos, os mesmos são transferidos para o grupo tiol do 4'-fosfopantetino adjacente ao domínio A. Em seguida, ocorre a elongação da cadeia peptídica nos domínios de condensação. No módulo 2 é representado um domínio de epimerização (E), convertendo o L-aminoácido na forma D. No domínio de clivagem (CV) o tripeptídeo formado é liberado da multienzima ou pela hidrólise, liberando um peptídeo linear, ou por um processo de ciclização, gerando um análogo cíclico

da estrutura cíclica envolve a reação "cabeça-cauda", o processo de ciclização pode ocorrer no domínio C com base na ocupação adequada de seus sítios doadores e aceptores.⁷⁸

Além dos domínios A, T, C e TE básicos para todas as NRPS, outros domínios adicionais podem compor a estrutura de um ou mais módulos de acordo com o produto final.⁸⁷ O domínio de Epimerização (**Domínio E**) com cerca de 450 aminoácidos catalisa a racemização dos L-aminoácidos, permitindo a presença de D-aminoácidos nos peptídeos formados. Adicionalmente, um peptídeo pode sofrer metilações ao longo de sua formação auxiliada pela NRPS, o que é conhecido por domínios de metilação (Domínio Mt) formados por cerca de 420 aminoácidos. Há nesse domínio outra particularidade que envolve o ponto onde ocorrerá a metilação, podendo o grupo metila ser introduzido no grupo amina (N-metilação) ou carboxi (C-metilação), ambas dependentes de S-adenosilmetionina (SAM).^{78,82,83,87}

A estrutura e a organização de uma dada NRPS pode ser predita, com ressalvas, a partir de seu produto final, pois na maior parte dos mecanismos conhecidos o processo ocorre de modo colinear.⁸⁴ No entanto, o seqüenciamento do genoma de muitos organismos facilitou a identificação ou até mesmo a revisão da estrutura de NRPS. A abordagem genômica é possível graças à existência de seqüências altamente conservadas no arcabouço das NRPS como aquelas para os domínios A, T e C.^{88,89}

A característica de síntese modular dos peptídeos não-ribossômicos confere a vantagem de se empregar esses compostos como candidatos para abordagens de biossíntese combinatória de rearranjos ou simples substituição dos módulos. De fato, a manipulação genética das NRPS configura-se em uma estratégia promissora para a obtenção de novos produtos com aplicações farmacêutica, agrícola e industrial. Cada módulo, bem como cada domínio de uma NRPS mantém sua atividade catalítica mesmo se separada do seu complexo multimodular, deixando claro que cada módulo é uma subunidade semiautônoma de síntese.⁸² O funcionamento dessas "biofábricas" vem sendo bastante úteis em biotecnologia tendo como base a manipulação das NRPS.⁸⁴ Acredita-se que somente pela alteração da especificidade do Domínio A para substratos distintos seja possível criar novas alternativas para a produção de peptídeos inéditos e, baseado em ensaios com receptores moleculares específicos, planejar, de forma racional, o desenvolvimento de novas estruturas bioativas.⁸⁴

Ferra *et al.* deletaram os domínios TE da porção C-terminal da surfactina sintetase, e obtiveram colônias que produziam a surfactina.⁹⁰ A realocação desses domínios em outra porção da enzima resultou na síntese de peptídeos com comprimentos reduzidos, demonstrando a importância da organização dos domínios das NRPS. Mootz *et al.* usaram uma estratégia distinta onde construíram um híbrido trimodular a partir dos dois primeiros módulos da tirociclina sintetase formando o peptídeo planejado.⁹¹ Uma conclusão relevante desses experimentos é que a natureza pode ter gerado, de modo muito semelhante ao evidenciado nesses exemplos, a diversidade de NRPS a partir da manipulação de genes.

Aliado com a expansão dos conhecimentos sobre a biologia molecular e os mecanismos genéticos de sua biossíntese, acredita-se que seja possível obter um número quase ilimitado de peptídeos altamente ativos.⁸⁷ A reprogramação de seqüências de NRPS para a produção de compostos novos com aplicação tecnológica de importantes peptídeos hormonais de vertebrados é certamente uma das áreas mais promissoras da química de produtos naturais, mas também um grande desafio.

Ciclotídeos: peptídeos macrocíclicos

Proteínas cíclicas estão distribuídas nos mais variados grupos de seres vivos, desde microrganismos até os vertebrados e plantas

superiores, e estão envolvidos nos processos fisiológicos desses organismos, e marcadamente nos mecanismos de defesa de plantas.²⁵ Tais moléculas apresentam em sua cadeia polipeptídica 14-78 resíduos de aminoácidos e podem ser claramente distinguidos de acordo com sua estrutura tridimensional (Figura 7). Há pouco mais do que cinco anos, pequenas proteínas circulares foram reconhecidas nos vegetais devido à sua importância para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente devido às suas características físico-químicas e estruturais muito peculiares. Esses compostos macrocíclicos reservam em sua cadeia polipeptídica 29-37 resíduos de aminoácidos proteinogênicos sendo seis deles, resíduos de cisteína altamente conservados e envolvidos em três ligações dissulfeto, além de apresentarem a ciclização “cabeça-cauda”. Na natureza, nenhuma outra proteína cíclica exibe tais configurações estruturais, de modo que compõem uma nova classe de substâncias, encontradas exclusivamente na biomassa vegetal. Craik *et al.* nomearam essa nova classe de substâncias protéicas como ciclotídeos (ciclo-peptídeos).³²

Kalata B1 foi o primeiro peptídeo macrocíclico vegetal a ter sua estrutura completamente elucidada (Quadro 2). A partir de então, outros foram isolados da biomassa vegetal e a comparação com o protótipo kalata B1 revelou as semelhanças estruturais dessas moléculas.

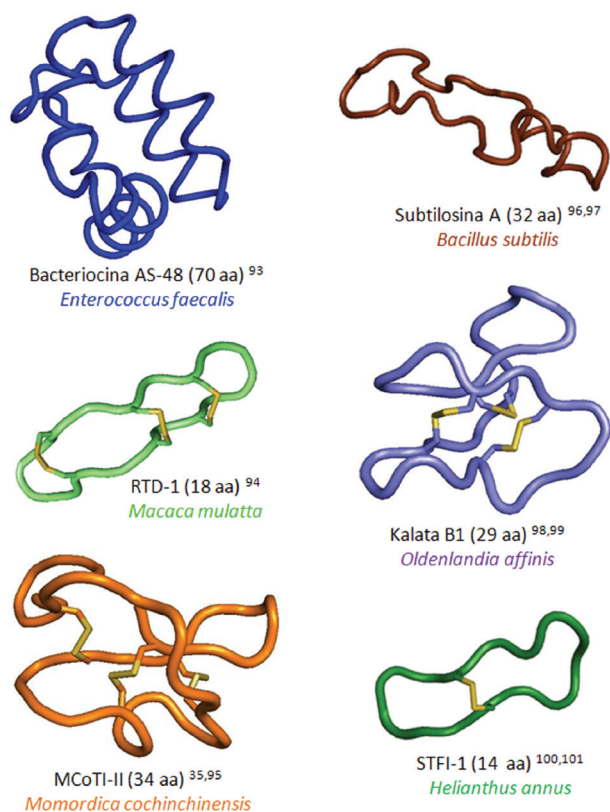


Figura 7. Estrutura tridimensional de seis mini-proteínas circulares de ocorrência natural (moléculas foram manipuladas a partir dos arquivos obtidos do site RCSB Protein Data Bank)⁹²

Inicialmente, pensou-se que os ciclotídeos fossem uma variação das defensinas vegetais devido às semelhanças estruturais observadas. As defensinas são pequenas proteínas (45-54 resíduos de aminoácidos) que retêm em sua estrutura oito resíduos de cisteína altamente conservados e que formam quatro ligações dissulfeto, responsáveis pela estabilização de sua estrutura tridimensional.¹⁰³ O conjunto dos resíduos de cisteína, bem como a organização das ligações dissulfeto formada é conhecida como “nó de cistina” (*Cystine Knot-CK*),

Quadro 2. Kalata B1 - do conhecimento popular à descoberta científica

Na década de 70, voluntários da Cruz Vermelha na atual República do Congo (antigo Zaire) registraram uma alta taxa de complicações no parto de mulheres da tribo Lulua, fazendo-se necessárias intervenções cirúrgicas.

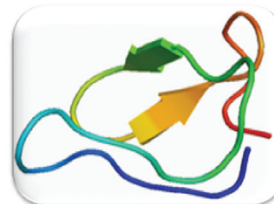
Lorents Gran, um médico norueguês, notou que essas mulheres preparavam um chá com as folhas de uma planta chamada kalata-kalata na língua Tsjiluba.



Oldenlandia affinis (Roem. & Schult.) DC.

O chá era ingerido a fim de aumentar as contrações uterinas e com isso acelerar o trabalho de parto.¹⁰²

Gran identificou nesse chá um composto protéico com 29 resíduos de aminoácidos que recebeu o nome kalata B1, responsável pela ação uterotônica do chá.



Gran também notou que as partes aéreas de *O. affinis* eram coletadas na estação chuvosa e então seca para o uso posterior. Essa foi a primeira informação sobre a sazonalidade da expressão dos ciclotídeos.²⁵ Porém, tanto a seqüência polipeptídica quanto a natureza cíclica dessa molécula permanecia desconhecida. Somente 25 anos depois, Seather *et al.* descreveram completamente a estrutura de kalata B1, bem como seu arranjo tridimensional único.^{98,99}

presente não somente nas defensinas, mas também em fatores de crescimento, inibidores de tripsina (MCoTIs)^{35,36} e inibidores de carboxipeptidase A de batata.¹⁰⁴ Distribuídas desde moluscos, insetos, vertebrados e vegetais, as defensinas são moléculas envolvidas na resposta imune inata, um sistema de defesa primitivo no combate às infecções microbianas.¹⁰³ Verificou-se ainda que os genes codificadores para algumas defensinas sofrem mutações muito rapidamente a fim de se manter o fenótipo adaptativo do organismo.¹⁰⁵

A similaridade estrutural dos ciclotídeos com as defensinas vegetais associada com a ação antimicrobiana e inseticida de certos ciclotídeos levou a construção da hipótese na qual os ciclotídeos se configurariam como moléculas chave do sistema de imunidade inata dos vegetais. No entanto, algumas diferenças entre defensinas e ciclotídeos possibilitaram caracterizá-los como grupos distintos, embora envolvidos no mesmo conjunto de reações fisiológicas. O primeiro ponto de distinção pode ser encontrado no cerne das atividades biológicas. Defensinas vegetais são incapazes de inibir a infecção bacteriana, exibindo essencialmente ação antifúngica e inibidora de enzimas digestivas (α -amilase).¹⁰³ Em contrapartida, os ciclotídeos são ativos contra um amplo espectro de microrganismos, bactérias ou fungos, e são capazes até mesmo de inibir proteinases digestivas (inseticida).¹⁰⁶ Para o organismo vegetal, o conjunto defensina-ciclotídeo varre quase a totalidade dos mecanismos de defesa inata, cada qual agindo sobre alvos específicos. Por fim, a diferença mais marcante entre tais grupos reside nas características estruturais únicas dos ciclotídeos.

Nas defensinas, o “nó de cistina” formado por quatro ligações dissulfeto é o principal responsável pela manutenção da estrutura cíclica e definição do arranjo 3-D da cadeia polipeptídica. Para as defensinas vegetais de *Raphanus sativus* L. - Rs-AFP-1 e Rs-AFP2^{107,108} - duas ligações dissulfeto estabilizam uma porção α -hélice/conformação- β ,

onde dois resíduos de cisteína estão na α -hélice (separadas por duas voltas completas da hélice), que formam a ligação com dois resíduos de cisteína presentes na conformação- β mais posterior (separados por um único resíduo de aminoácido) (Figura 8).¹⁰³

O alinhamento dos resíduos de todas as defensinas vegetais já descritas na literatura (referenciados pelos resíduos de cisteína altamente conservados) revela um grau de similaridade de 25% na seqüência peptídica.¹⁰³ Esse dado comprova a presença de resíduos de cisteína na estrutura peptídica e a homologia dessas defensinas.

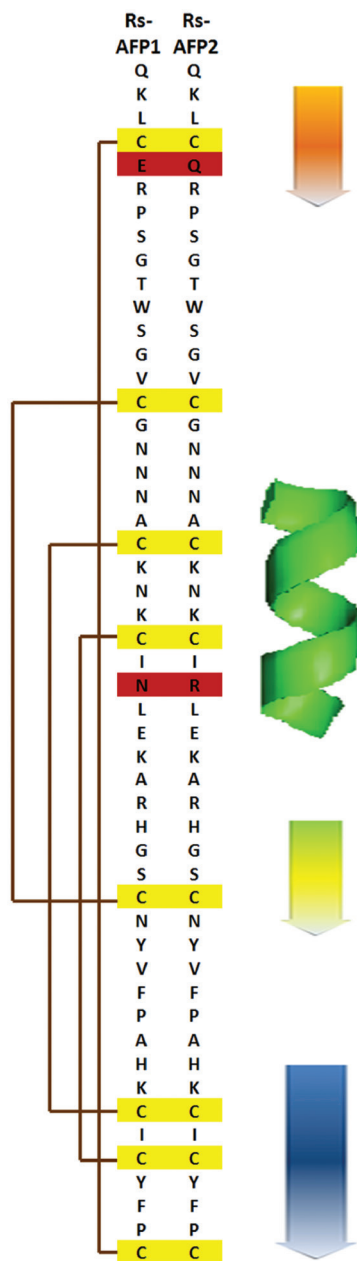


Figura 8. Estrutura das defensinas vegetais. Na porção superior está representada a seqüência de aminoácidos das proteínas antifúngicas 1 e 2 de *Raphanus sativus* L. (Rs-AFP 1 e Rs-AFP 2 - *Raphanus sativus* Antifungal Protein). Em amarelo estão representados os resíduos de cisteína altamente conservados; em vermelho, os resíduos diferentes para esses compostos; em marrom, as quatro ligações dissulfeto formadas. Na porção inferior estão representados os elementos de estrutura secundária das Rs-AFP1 e Rs-AFP2. A espiral indica a porção de α -hélice e as setas as porções de fita- β de Rs-AFP1 e Rs-AFP2. Adaptada da ref. 103

O “nó de cistina” nos ciclotídeos é estruturado de tal modo que um anel macrocíclico é formado por duas ligações dissulfeto (Cys^I-Cys^{IV} e Cys^{II}-Cys^V), enquanto que a terceira ligação dissulfeto (Cys^{II}-Cys^{VI}) penetra nesse anel. Baseado na similaridade das seqüências do ciclotídeos conhecidos mostrou-se que o nó de cisteína (CK) é comum a todo o grupo.²⁴ Esse modelo de CK presente nos ciclotídeos caracteriza o grupo de CK-inibidores, diferindo daqueles onde o anel macrocíclico é penetrado pela ligação dissulfeto Cys^I-Cys^{IV} (CK-fatores de crescimento).¹⁰⁹ Fica patente que a construção do “nó de cistina” categoriza grupos distintos geométrica e topologicamente que não são sobreponíveis e com atividades biológicas distintas.¹¹⁰ No entanto, a peculiaridade estrutural observada nos ciclotídeos pode ser entendida com a manutenção da estrutura baseada na ciclização “cabeça-cauda” da cadeia polipeptídica, definindo o que Craik *et al.* nomearam de “nó de cistina cíclico” (*cyclic cystine knot-CCK* – Figura 9).³² Tais características conferem aos ciclotídeos maior estabilidade à degradação térmica, química e enzimática, tornando-os uma classe única e inédita na história da química de produtos naturais.

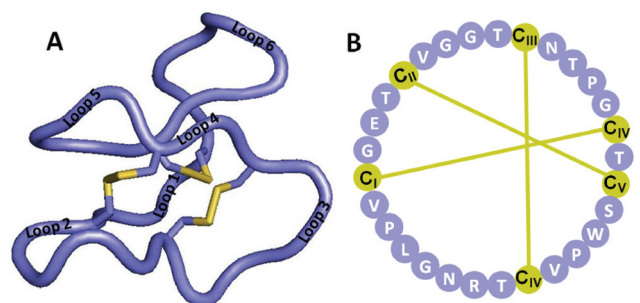


Figura 9. Ciclotídeo modelo – Kalata B1. A – Esquema tridimensional em Cartoon, construído com Pymol, mostrando as ligações dissulfeto em amarelo (molécula manipulada a partir do banco de dados PDB);^{92,99} B – Diagrama esquemático evidenciando os resíduos de aminoácido que formam os loops (roxo) do ciclotídeo kalata B1 e os resíduos de cisteína envolvidos na CCK (amarelo)

O arranjo 3-D dos ciclotídeos é definido pelo CCK e apresenta um desvio angular da geometria β .^{23,32,98,111} Interessantemente, um novo grupo de peptídeos macrocíclicos parece dividir algumas características estruturais com os ciclotídeos. Os peptídeos MCoTI-I e MCoTI-II isolados de sementes de *M. cochinchinensis* foram inicialmente enquadrados como os primeiros inibidores de tripsina de natureza cíclica. Ambos são constituídos por uma cadeia polipeptídica de 34 resíduos de aminoácidos e a estrutura cíclica contém tanto o CK (formado por três ligações dissulfeto com o mesmo padrão de conectividade dos ciclotídeos) quanto a ciclização “cabeça-cauda”, caracterizando assim um grupo de peptídeos macrocíclicos CCK.²⁵ Entretanto, quando feito o alinhamento das seqüências primárias dos inibidores de tripsina de Cucurbitaceae com os ciclotídeos conhecidos, evidenciou-se pouca ou nenhuma similaridade além dos seis resíduos de cisteína altamente conservados para ambos. No entanto, 48-70% de identidade na seqüência dos resíduos foram encontrados para outros inibidores de tripsina de Cucurbitaceae.^{25,35,36} Assim, a relação evolutiva entre essas suas classes distintas de peptídeos macrocíclicos ainda é obscura merecendo estudos adicionais de biossíntese.

É possível ainda identificar na estrutura 3-D de um ciclotídeo seis loops, que são regiões topologicamente fundamentais para as atividades biológicas dos ciclotídeos, nos quais as cadeias laterais dos aminoácidos são expostas e modulam as atividades biológicas exibidas pelos ciclotídeos (Figura 9). Baseado na análise da estrutura primária da cadeia polipeptídica dos ciclotídeos já descritos é possível

dividí-los em duas subfamílias. A presença de uma ligação peptídica *cis*-prolina no *loop 5*, confere à estrutura do ciclotídeo uma torção na sua estrutura terciária, caracterizando a subfamília *Möbius*³² - kalata B1,⁹⁸ violapeptídeo 1¹¹² e varv peptídeo A-H.^{112,113} A ausência da ligação *cis*-prolina, ou seja, todas as ligações peptídicas encontram-se na configuração *trans*, caracteriza a subfamília *Bracelet*³² - circulinas A-D^{114,115} e ciclopsicotrídeo A.¹¹⁶

O alinhamento dos *loops* dos ciclotídeos conhecidos mostra graus variáveis de homologia de sequência polipeptídica tanto dentro quanto entre as duas subfamílias.^{102,110,117} Quando comparadas as sequências primárias dos ciclotídeos conhecidos para cada subfamília, registra-se 80% de identidade para os ciclotídeos *Möbius*, enquanto que para o ciclotídeo *Bracelet* a identidade da cadeia polipeptídica é de aproximadamente 54% (Figura 10). Possivelmente, o elevado grau de conservação das seqüências primárias dos ciclotídeos sugere o envolvimento desses compostos nos mecanismos de defesa do vegetal contra o ataque de patógenos.¹¹⁸

Os *loops 1* e *4* estão diretamente relacionados com a conectividade das ligações dissulfeto, de modo que os *loops 1* e *4* têm fundamental relevância para a construção do anel macrocíclico que

é penetrado pela terceira ligação dissulfeto. Pode-se, dessa forma, entender os *loops 1* e *4* como determinantes do CCK e, conseqüentemente, essas duas regiões exibem alto grau de conservação dos resíduos, tanto em tamanho quanto em composição.¹⁰² De fato, o resíduo de ácido glutâmico (Glu³) no *loop 1*, altamente conservado nos ciclotídeos, parece estar envolvido na estabilização do anel cíclico pela formação de ligações de hidrogênio com resíduos dos *loops 2* e *3* que contêm grupos carregados em suas cadeias laterais como hidroxilas.¹²³

Outros resíduos também são conservados devido a sua importância para o estabelecimento da estrutura tridimensional do ciclotídeo. O resíduo de glicina (Gly¹⁴) no *loop 3* é bem conservado para a maior parte dos ciclotídeos. Esse resíduo é flanqueador do resíduo Cys^{1V} e acredita-se que essa localização com tal padrão de conservação desempenha, portanto, função estrutural para a manutenção do CCK. Topologicamente, esse resíduo de glicina apresenta um ângulo ϕ crucial para o estabelecimento da ligação dissulfeto entre Cys¹-Cys^{IV} do *loop 3* no motivo CCK, formando nesse ponto da molécula o seu menor anel que somente pela presença de um resíduo compacto como a glicina permite que a ligação dissulfeto penetre no núcleo cíclico

	I	II	III	IV	V	VI	REF.
MÖBIUS	loop 1	loop 2	loop 3	loop 4	loop 5	loop 6	
Kalata B1	C G E T C	V G G T -	C - - N T P	G C T C -	- S W - P	V C T R N G - L P V	98
Kalata B2	C G E T C	F G G T -	C - - N T P	G C S C -	- T W - P	I C T R D G - L P V	32
Kalata B3	C G E T C	F G G T -	C - - N T P	G C T C -	D P W - P	I C T R D G - L P T	32
Kalata S	C G E T C	V G G T -	C - - N T P	G C S C -	- S W - P	V C T R N G - L P V	32
varv peptídeo A	C G E T C	V G G T -	C - - N T P	G C S C -	- S W - P	V C T R N G - L P V	113
varv peptídeo B	C G E T C	F G G T -	C - - N T P	G C S C -	D P W - P	M C S R N G - L P V	112
varv peptídeo C	C G E T C	V G G T -	C - - N T P	G C S C -	- S W - P	V C T R N G - V P I	112
varv peptídeo D	C G E T C	V G G S -	C - - N T P	G C S C -	- S W - P	V C T R N G - L P I	112
varv peptídeo E	C G E T C	V G G T -	C - - N T P	G C S C -	- S W - P	V C T R N G - L P I	112
violapeptídeo 1	C G E T C	V G G T -	C - - N T P	G C S C -	- S R - P	V C T X N G - L P V	112
vodo M	C G E S C	F T G K -	C - - Y T V	Q C S C -	- S W - P	V C T R N G - A P I	119
vodo N	C G E T C	T L G K -	C - - Y T A	G C S C -	- S W - P	V C Y R N G - L P V	119
BRACELET	loop 1	loop 2	loop 3	loop 4	loop 5	loop 6	
circulina A	C G E S C	V W I P -	C I S A A -	L G C S C -	- - K N K V	C Y R N G - I P -	114
circulina B	C G E S C	V F I P -	C I S T L -	L G C S C -	- - K N K V	C Y R N G V I P -	114
circulina C	C G E S C	V F I P -	C I T S V -	A G C S C -	- - K S K V	C Y R N G - I P -	115
circulina D	C G E S C	V W I P -	C V T S I -	F N C K C -	- - E N K V	C Y H D K - I P -	115
circulina E	C G E S C	V W I P -	C L T S V -	F N C K C -	- - E N K V	C Y H D K - I P -	115
circulina F	C G E S C	V W I P -	C I S A A -	I G C S C -	- - K N K V	C Y Y R A - I P -	115
cicloviolina A	C G E S C	V F I P -	C I S A A -	I G C S C -	- - K N K V	C Y R N G V I P -	120
cicloviolina B	C G E S C	Y V L P -	C F T V -	- G C T C -	- - T S S Q	C F K N G T A -	120
cicloviolina C	C G E S C	V F I P -	C L T T V -	A G C S C -	- - K N K V	C Y R N G - I P -	120
cicloviolina D	C G E S C	V F I P -	C I S A A -	I G C S C -	- - K N K V	C Y R N G - F P -	120
cicloviolacina O1	C A E S C	V Y I P -	C T V T A L	L G C S C -	- - S N R V	C Y - N G - I P -	32
cicloviolacina O2	C G E S C	V W I P -	C I S S A -	I G C S C -	- - K S K V	C Y R N G - I P -	32
cicloviolacina O3	C G E S C	V W I P -	C L T S A -	I G C S C -	- - K S K V	C Y R N G - I P -	32
cicloviolacina O4	C G E S C	V W I P -	C I S S A -	I G C S C -	- - K N K V	C Y R N G - I P -	32
vhr1	C A E S C	V W I P -	C T V T A L	L G C S C -	- - S N K V	C Y - N G - I P -	25
kalata B5	C G E S C	V Y I P -	C I S G V -	I G C S C -	- - T D K V	C Y L N G - T P -	32
hupa A	C A E S C	V Y I P -	C T I T A L	L G C S C -	- - K N K V	C Y - N G - I P -	121
ciclopsicotrídeo A	C G E S C	V F I P -	C T V T A L	L G C S C -	- - K S K V	C Y K N S - I P -	116
palicoureína	C G E T C	R V I P V	C T Y S A A	L G C T C	D D R S D G L	C K R N G D - P T F	122

Figura 10. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos para alguns ciclotídeos. As seqüências foram alinhadas com base nos resíduos de cisteína. Em amarelo estão representados os resíduos de cisteína altamente conservados; em verde, regiões conservadas e que estão associadas com a conectividade do "nó de cistina cíclico" ou com a estabilização da estrutura cíclica; em azul, seqüência conservada que caracteriza o sítio de processamento do precursor biossintético; em vermelho, resíduo de *cis*-Prolina determinante da subfamília *Möbius*; em marrom, as ligações dissulfeto do "nó de cistina cíclico"

da molécula.¹²³ Os resíduos Gly₂ e Gly₂₆ presentes nos *loops* 1 e 6, respectivamente, também são conservados e aqueles presentes no *loop* 2 (Gly⁷ e Gly⁸) parecem ser conservados somente para a subfamília *Möbius* e alguns ciclotídeos *Bracelet*.¹¹⁸

Com exceção da palicoureína (5 resíduos), o *loop* 2 é composto sempre por 4 resíduos com seqüências homólogas bem conservadas dentro de cada subfamília. No entanto, as maiores variações são observadas no corpo do *loop* 6, onde na subfamília *Bracelet* pode variar de 5-8 resíduos, enquanto que para a subfamília *Möbius* é composto por 7 resíduos.^{32,118} É justamente no *loop* 6 que se conserva a seqüência RNG(I/L)P, a qual pode ser identificada no precursor biossintético do ciclotídeo como uma seqüência flanqueadora do sítio de processamento e ciclização.^{25,106} Acredita-se que o resíduo de asparagina (N) seja essencial para as alterações pós-traducionais responsáveis pela clivagem e ciclização do ciclotídeo.¹¹⁸

O conjunto das características que formam a estrutura cíclica destes compostos, ou seja, o CK, as ligações de hidrogênio intramoleculares e a ciclização cabeça-cauda são fatores determinantes de suas propriedades físico-químicas únicas e que é responsável pelas atividades biológicas desses compostos. Colgrave & Craik, concluíram em seus estudos com o ciclotídeo kalata B1, que a ausência de extremidades *N*- e *C*-terminal dificulta o seu reconhecimento pelas proteases o que está de acordo com a alta estabilidade exibida pelos ciclotídeos frente à degradação química e enzimática.¹²⁴ O CK está diretamente envolvido com a estabilidade térmica dos ciclotídeos, mantendo sua estrutura tridimensional intacta mesmo após condições de fervura, evitando a desnaturação total ou parcial do ciclotídeo. Isto explica a retenção da atividade biológica, mesmo após o tratamento térmico drástico.¹⁰²

A prospecção de compostos naturais baseados no *screening* bioguiado identificou alguns outros ciclotídeos revelando uma gama diversa de atividades biológicas onde os ciclotídeos figuravam com agentes ativos. Desse modo, encontramos ciclotídeos como a palicoureína e as circulinas com ação anti-HIV; violapeptídeo I com ação hemolítica; ciclopsicotrídeo A e as circulinas (A, B) agindo como antagonista da neurotensina e kalata B1 com potencial citotóxico (Tabela 3).

Tam *et al.* sugerem que tal interação pode ser eletrostática, uma vez que os ciclotídeos testados perderam a atividade em condições salinas drásticas (100 mM NaCl).¹²⁵ Essa hipótese também é sustentada pelos experimentos de interação com membranas artificiais feitas por Kamomori *et al.*¹²⁶ Os ciclotídeos kalata B1 e B6 interagiram preferencialmente com membranas lipossômicas contendo dimiristoil-*L*- α -fosfatidiletanolamina – DMPE, indicando que esses ciclotídeos interagiram seletivamente com membranas bacterianas. A interação de kalata B1 frente a membranas artificiais construídas com dodecilsulfocolina foi monitorada usando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) onde se evidenciou os *loops* hidrofóbicos como sendo os sítios preferenciais de interação com a membrana. Os resíduos carregados Glu e Arg nos *loops* 1 e 6, respectivamente, são segregados do lado oposto da molécula e, em contato com a cabeça polar do lipídeo e durante a incorporação na membrana, há uma ligeira alteração na conformação tridimensional de kalata B1.¹²⁷

Embora os mecanismos de ação dos ciclotídeos sob seus alvos moleculares não sejam ainda bem conhecidos, o conjunto das atividades biológicas reportadas até o momento e os dados sobre a interação com membranas parecem indicar para um modo de ação no qual os ciclotídeos se associam com as membranas plasmáticas promovendo a ruptura da membrana celular.

Tabela 3. Atividades biológicas dos ciclotídeos

Ciclotídeo	Espécie Vegetal	F ¹	aa ²	Massa ³	Atividade	Potência	Ref.
Ciclopsicotrídeo A	<i>Psychotria longipes</i> Muell. Arg.	R	31	3229,5	Antagonista da neurotensina	IC ₅₀ 3 μ M	116
					Antimicrobiano	MIC 1,55 μ M	125
Cicloviolacinas A-D	<i>Leonia cymosa</i> Mart.	V	28-31	2886-3212	Anti-HIV	EC ₅₀ 130 nM	120
Cicloviolacina O2	<i>Viola odorata</i> L.	V	30	3141,0	Citotóxico	IC ₅₀ 0,1-0,3 μ M	128
Circulina A e B	<i>Chasalia parvifolia</i> Schum.	R	30/31	3152/3284	Anti-HIV	EC ₅₀ 40-275 nM	117
					Antimicrobiano	MIC 0,19 e 0,41 μ M	125
Kalata B1	<i>Oldenlandia affinis</i> (Roem. & Schuld.) DC.	R	29	2892,0	Anti-HIV	EC ₅₀ 140 nM	117
					Uterotônico	ND	129
					Antimicrobiano	MIC 0,26 μ M	125
					Inseticida	0,8 μ M/g	106
					Hemolítico	ND	130
Palicoureína	<i>Palicourea condensata</i> Standl.	R	37	3904,1	Anti-HIV	EC ₅₀ 100 nM	122
Varv peptídeo A	<i>Viola arvensis</i> Murr.	V	29	2877,9	Citotóxico	IC ₅₀ 3-6 μ M	131
Varv peptídeo E	<i>Viola arvensis</i> Murr.	V	29	2892,2	Citotóxico	IC ₅₀ 4 μ M	131
Varv peptídeo F	<i>Viola arvensis</i> Murr.	V	29	2959,4	Citotóxico	IC ₅₀ 2,6-7,4 μ M	128
Vitri A	<i>Viola tricolor</i> L.	V	30	3152,8	Citotóxico	IC ₅₀ 0,6-1 μ M	131

¹ Famílias Botânicas, sendo R – Rubiaceae e V – Violaceae. ²Tamanho da cadeia polipeptídica (n° de resíduos de aminoácidos). ³ Massa molecular (Daltons). MIC - *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentração Inibitória Mínima); ND – não determinado; IC₅₀ – Concentração inibitória requerida para inibição de 50% da ligação da neurotensina à membrana celular ou para agentes citotóxicos, a concentração que inibe o crescimento de linhagens tumorais em 50%; EC₅₀ – Concentração molar de um agonista, ou seja, que provê 50% de proteção celular

ASPECTOS SOBRE A BIOSÍNTESE DOS CICLOTÍDEOS

As rotas de biossíntese que levam aos ciclotídeos ainda permanecem em grande parte incompreendidas. Questões fundamentais, como a localização intracelular do processamento desses compostos, bem como os fatores que controlam a sua produção e, principalmente, como procede a ciclização da cadeia polipeptídica, precisam ser entendidas. A parte de tais lacunas, para o entendimento da biossíntese dos ciclotídeos, sabe-se que esses compostos protéicos são originários de um sistema ribossomal de síntese, onde os aminoácidos são ativados pela aminoacil-tRNA sintetase como ésteres de tRNA e formação da ligação peptídica nos sítios do ribossomo, ou seja, são produtos gênicos verdadeiros.^{132,133} Essa via ribossomal é apresentada em maiores detalhes a seguir, a despeito dos poucos estudos sobre os mecanismos que regem esse sistema biossintético.

Síntese ribossomal de peptídeos

O grande interesse pela busca por novos ciclotídeos vegetais com a expansão do entendimento de seu papel biológico e modos de ação em alvos moleculares não reside unicamente nas suas peculiaridades estruturais. O potencial destes ciclopeptídeos para o desenvolvimento de fármacos, creditado aos ciclotídeos, é o que realmente desperta a atenção tanto da comunidade científica quanto da indústria farmacêutica.^{110,118} Invariavelmente, para que toda a sorte de possibilidades para a exploração do potencial dos ciclotídeos como protótipos de fármacos seja acessível à criatividade científica, torna-se imperioso o entendimento dos mecanismos moleculares que regem a sua biossíntese.

Assim como as proteínas, os ciclotídeos compostos por *L*-aminoácidos estão sobre o controle direto do genoma do organismo; são produtos da expressão gênica e com isso os mecanismos de regulação e síntese podem ser modificados pelas técnicas da biotecnologia/biologia molecular.¹³⁴ A identificação dos genes que expressam esses compostos é uma etapa essencial para construção de bibliotecas de peptídeos bioativos. É com esse interesse que se propõe não apenas a bioprospecção dos constituintes peptídicos, mas também dos genes envolvidos na sua formação.¹³⁵

Grande parte dos genes responsáveis pela expressão de proteínas circulares de micro-organismos, como a micromicina, já é conhecida. No entanto, apenas recentemente foram descritos alguns dos genes que direcionam para a síntese dos ciclotídeos vegetais.²⁵ Os ciclotídeos vegetais podem ser considerados como mini-proteínas e todo conjunto de características físico-químicas define essa nova classe de substâncias como excelentes protótipos moleculares para desenvolvimento de fármacos proteicos.¹³⁶ Esses compostos proteicos são produtos genéticos, cujas sequências são codificadas no genoma do organismo e, embora muito pouco seja conhecido sobre os mecanismos de síntese e regulação desses compostos, acredita-se que todos sejam derivados de precursores protéicos extensos com posterior clivagem e ciclização da cadeia peptídica. Grande parte dos genes responsáveis pela expressão de proteínas circulares e alguns ciclotídeos é conhecida, mas até o momento não foi identificada nenhuma enzima responsável pela clivagem e ciclização do polipeptídeo. O estudo mais detalhado das estruturas dos precursores biossintéticos lineares pode revelar algumas características essenciais sobre o processamento dessa longa cadeia polipeptídica que leva ao ciclotídeo.²⁵

Jennings *et al.* identificaram quatro genes (*Oak1-4*) para a expressão dos ciclotídeos kalata B de *O. affinis* (Roem. & Schult.) D.C.¹⁰⁶ Todos os genes caracterizados codificam um precursor linear longo contendo 1-3 domínios para o ciclotídeo (Figura 11). Ademais, cada precursor carrega uma porção sinalizadora (20 aminoácidos)

que o direciona para o retículo endoplasmático. Dessa forma, os precursores entram na via secretora da célula, sendo que o processamento posterior do precursor ocorre no interior dos compartimentos membranosos.

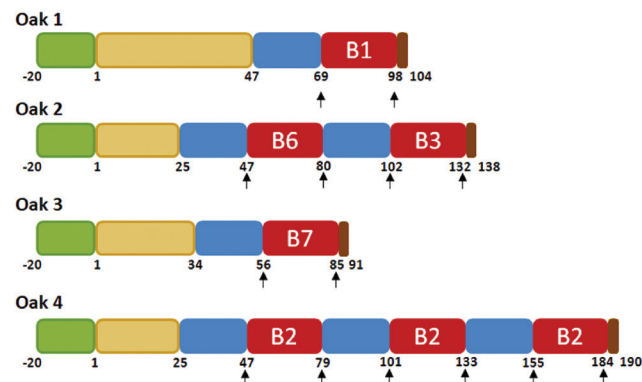


Figura 11. Esquema dos precursores protéicos codificados pelos clones *Oak1-4*. Verde - seqüência sinal para retículo endoplasmático; Vermelho - regiões correspondentes aos peptídeos kalata maduros; Azul - seqüências de separação entre os domínios dos ciclotídeos - N-terminal repetida (NTR); Bege - seqüências N-terminais pró-domínio (NTPD); Marrom - cauda hidrofóbica. As setas indicam as posições onde ocorre a clivagem dos ciclotídeos do propeptídeo. Adaptado da ref. 106

Os domínios para um ciclotídeo são separados por regiões altamente conservadas com 25 aminoácidos, chamados de *N*-terminal repetido (NTR). Cada precursor contém ainda uma região *N*-terminal pró-domínio (NTPD) com extensão variável. Existe somente uma NTPD por precursor e aparentemente não desempenha qualquer função no processo de maturação do ciclotídeo. Diferentemente, as NTR conservam uma seqüência de 25 aminoácidos que formam uma α -hélice que além de um provável papel no processamento dos ciclotídeos, estaria diretamente ligado ao transporte do ciclotídeos pela via secretora.^{137,138}

De acordo com as observações obtidas a partir da análise da estrutura e organização dos precursores dos ciclotídeos kalata B é possível inferir sobre os sítios de processamento e sua compartimentalização. As ligações dissulfeto seriam assim formadas ainda no cerne do precursor no interior do retículo endoplasmático e após essa etapa os precursores seriam levados ao Complexo de Golgi, onde acredita-se que ocorra a clivagem e a ciclização do peptídeo.¹³⁸ O estabelecimento das ligações dissulfeto tornaria as porções *N*- e *C*-terminais do domínio de um ciclotídeo próximas o suficiente para que ocorra a clivagem e a ciclização. Nesse momento, parece ser crucial a presença de um resíduo de Asn ou Asp na porção *C*-terminal que, assim como a *N*-terminal, é flanqueado por uma tríade de aminoácidos conservados, usualmente Gly-Leu-Pro (Figura 12). O ciclotídeo retém uma cópia da seqüência flanqueadora e assim corrobora a hipótese de que esse seja o verdadeiro sítio de clivagem.¹⁰⁶ No caso do clone *Oak4*, com três cópias de kalata B2, a região *C*-terminal é flanqueada pela tríade Ser-Leu-Pro e a retenção da seqüência Gly-Leu-Pro no ciclotídeo indica que o sítio de clivagem para kalata B2 ocorre nas ligações peptídicas anteriores aos resíduos de Gly *N*-terminal e Ser *C*-terminal.¹⁰⁶ Muitas proteinases poderiam catalisar a clivagem do ciclotídeo, no entanto, nenhuma enzima que acomode o resíduo de Asn ou Asp na posição P1 foi encontrada em vegetais. Contudo, asparaginil endoproteínases isoladas de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. sugerem a possibilidade de que a clivagem bem como a ciclização sejam eventos enzimáticos, mas não descarta a possibilidade desses eventos serem autocatalíticos.^{133,139}

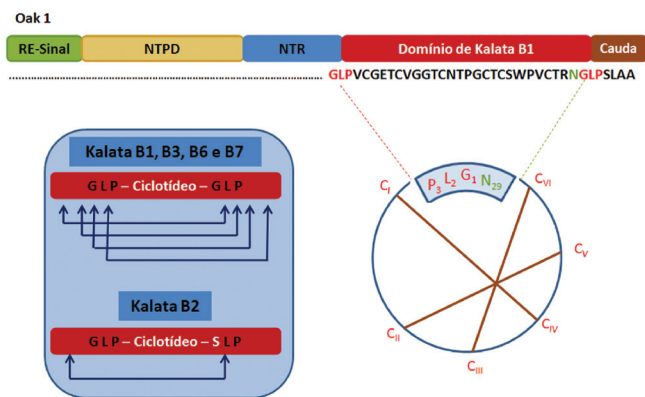


Figura 12. Sítios de clivagem e ciclização dos ciclotídeos kalata B. O peptídeo retém uma cópia das seqüências flanqueadoras. No box azul estão delineados os possíveis sítios de clivagem para kalata B1, B3, B6 e B7 e o sítio de clivagem para kalata B2 com a seqüência SLP, com a clivagem ocorrendo antes dos resíduos G e S. Modificado a partir das refs. 106 e 142

De acordo com a hipótese acima exposta e aceita atualmente para descrever alguns pontos cruciais na ordem de desencadeamento dos eventos que ocorrem na via biossintética dos ciclotídeos, acredita-se que a formação das ligações dissulfeto seja anterior à clivagem dos ciclotídeos da preproteína precursora e da ciclização.^{98,106,110} Entretanto, ambos os processos, excisão e ciclização, e as enzimas envolvidas em cada passo biossintéticos não foram, até o momento, identificados.

Embora se tenha comprovado que a expressão dos ciclotídeos é mais acentuada nas folhas jovens do que em outras partes da planta, alguns ciclotídeos de Violaceae foram isolados das partes subterrâneas (raízes) e com composição um tanto quanto distinta daqueles encontrados em partes aéreas.¹⁰⁶ Tal distribuição ao longo do corpo vegetal sugere que certos ciclotídeos possam ter ação direcionada para determinados patógenos.¹¹⁰

A distribuição dos ciclotídeos, embora restrita a duas famílias de Angiospermae (Violaceae e Rubiaceae) – filogeneticamente distantes¹⁴⁰ – apresentam os genes que os codificam altamente conservados.¹³⁸ Entretanto, há pouco tempo foram identificados, em algumas espécies de Poaceae, seqüências de DNA para a expressão de proteínas circulares com altas taxas de identidade com os ciclotídeos.²⁴ Essa constatação cria um novo cenário para a distribuição e evolução dos ciclotídeos nas plantas superiores. Virtualmente, os ciclotídeos (ou seus genes codificadores) podem estar distribuídos de modo mais amplo do que originalmente previsto, sendo que abrange classes tão distintas e evolutivamente divergentes quanto dicotiledôneas e monocotiledôneas. Certamente, os genes codificadores para os ciclotídeos devem ter evoluído anteriormente à cisão e entre essas classes de angiospermas,¹³⁸ há mais de 150 milhões de anos na era Mesozóica, a partir de um gene ancestral em comum.²⁴

Atualmente a perspectiva de manipulação genética à luz da moderna biologia molecular inspira a construção de bibliotecas de genes para a prospecção de novos ciclotídeos planejados especificamente para certos receptores biológicos, seja com aplicação farmacêutica, agroquímica ou industrial. A relativa incompreensão dos mecanismos moleculares *in vivo*, durante a biossintese dos ciclotídeos, torna a abordagem biotecnológica ainda incipiente. Alternativamente, a síntese em fase sólida avançou muito em relação à construção de novos compostos peptídicos. A partir da química combinatória, com relativa facilidade na ciclização da cadeia polipeptídica e no estabelecimento das ligações dissulfeto é possível sintetizar qualquer estrutura peptídica.^{138, 141}

A produção de ciclotídeos e a ativação de sua expressão empregando-se condições controladas em suspensão de cultura de células

é uma promissora tentativa a fim de se reconhecer os mecanismos envolvidos na regulação de etapas metabólicas.¹⁴² A expressão heteróloga, usando microrganismos como células hospedeiras, configura-se na alternativa mais atrativa para a manipulação dos genes dos ciclotídeos. Entretanto, a expressão heteróloga completa será possível somente após a identificação de todos os genes e conjuntos gênicos envolvidos na biossintese, inclusive os responsáveis por possíveis enzimas de clivagem e ciclização. Mesmo na ausência de uma completa compreensão dos passos biossintéticos, kalata B1 e MCoTI-II foram expressos em células procarióticas, baseando-se em etapas de ciclização *in vivo* por meio de uma versão intra-molecular da ligação química nativa (*Native Chemical Ligation* – NCL).^{133,136,143}

De qualquer forma, as miniproteínas circulares, em especial os ciclotídeos, representam uma fabulosa fonte de novos fármacos e as ferramentas disponíveis para a manipulação biotecnológica tornam seu potencial quase ilimitado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A química de produtos naturais até pouco tempo focalizou fundamentalmente metabólitos secundários. Com advento da biologia molecular e de novas ferramentas de análise de substâncias em matrizes complexas assim como o mapeamento metabólico de grupos vegetais, as macromoléculas de plantas e grupos de peptídeos de interesse biológico passaram a ocupar espaço nos estudos da fitoquímica praticada nos países ditos centrais. O fato de termos uma riqueza biológica fantástica a ser desvendada abre caminhos alternativos e inovadores para a química de produtos naturais que se faz no Brasil, e os peptídeos de plantas assumem importância ímpar neste contexto de novas tendências da fitoquímica moderna. A presente revisão tem como objetivo instigar a comunidade brasileira que estuda plantas dos vários biomas a olhar os peptídeos como uma fonte valiosa de estudo, principalmente de espécies tropicais onde muito pouco se sabe sobre suas funções de regulação, adaptação e defesa.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de apoio à pesquisa FAPESP, CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas e auxílio pesquisa, projeto temático proc. 03/02176-7 Biota-FAPESP.

REFERÊNCIAS

1. Tulp, M.; Bohlin, L.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 405.
2. Tulp, M.; Bohlin, L.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 225.
3. Cragg, G. M.; Newman, D. J.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23, 404.
4. Gura, T.; *New Scientist* **2000**, 2226, 24.
5. Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 45.
6. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022.
7. Menezes, H.; Jared, C.; *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2002**, 132, 1.
8. Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, 24, 536.
9. Matsubayashi, Y.; Yang, H. P.; Sakagami, Y.; *Trends Plant Sci.* **2001**, 6, 573.
10. Lindsey, K.; Casson, S.; Chilly, P.; *Trends Plant Sci.* **2002**, 7, 78.
11. Matsubayashi, Y.; Sakagami, Y.; *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, 57, 649.
12. Lindsey, K. *Curr. Biol.* **2001**, 11, R741.
13. Pearce, G.; Strydom, D.; Johnson, S.; Ryan, C. A.; *Science* (Washington, DC, U. S.) **1991**, 253, 895.

14. Clark, S. E.; Running, P.; Meyerowitz, E. M.; *Development* (Cambridge, U. K.) **1995**, *121*, 2057.
15. Matsubayashi, Y.; Sakagami, Y.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 7623.
16. Van Der Sande, K.; Pawlowiski, K.; Czaja, I.; Wieneke, U.; Schell, J.; Schmidt, J.; Walden, R.; Matvienko, M.; Wellink, J.; Van Kammen, A.; Franssen, H.; Bisseling, T.; *Science* (Washington, DC, U. S.) **1996**, *273*, 370.
17. Topping, J. F.; Lindsey, K.; *Plant Cell* **1997**, *9*, 1713.
18. Schopfer, C. R.; Nasrallah, M. E.; Nasrallah, J. B.; *Science* (Washington, DC, U. S.) **1999**, *286*, 1697.
19. Butenko, M. A.; Patterson, S. E.; Grini, P. E.; Stenvik, G. E.; Amundsen, S. S.; *Plant Cell* **2003**, *15*, 2296.
20. Wen, J.; Lease, K. A.; Walker, J. C.; *Plant J.* **2004**, *37*, 668.
21. Narita, N. N.; Moore, S.; Horiguchi, G.; Kubo, M.; Demura, T.; *Plant J.* **2004**, *38*, 699.
22. Bogdanowich-Knipp, S. J.; Jois, D. S. S.; Siahaan, T. J.; *J. Pept. Sci.* **1999**, *53*, 523.
23. Craik, D. J.; *Toxicon* **2001**, *39*, 1809.
24. Mulvena, J. R.; Mylne, J. S.; Bharathi, R.; Burton, R. A.; Shirley, N. J.; Fincher, G. B.; Anderson, M. A.; Craik, D. J.; *Plant Cell* **2006**, *18*, 2134.
25. Trabi, M.; Craik, D. J.; *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 132.
26. Tugyi, R.; Mezö, G.; Fellinger, E.; Andreu, D.; Hudecz, F.; *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 642.
27. Ramaswami, V.; Haaseth, R. C.; Matsunaga, T. O.; Hruba, V. J.; O'Brien, D. F.; *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1992**, *1109*, 195.
28. Claesson, P.; Göransson, U.; Johansson, S.; Luijendijk, T.; Bohlin, L.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 77.
29. Zhou, J.; Tan, N. H.; *Chinese Science Bulletin* **2000**, *45*, 1825.
30. Tan, N. H.; Zhou, J.; *Chem. Rev.* (Washington, DC, U. S.) **2006**, *106*, 840.
31. Kaufmann, H. P.; Tobschirbel, A.; *Chemische Berichte* **1959**, *92*, 2805.
32. Craik, D. J.; Daly, N. L.; Bond, T.; Waine, C.; *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1327.
33. Huang, R.-H.; Xiang, Y.; Liu, X.-Z.; Zhang, Y.; Hu, Z.; Wang, D.-C.; *FEBS Lett.* **2002**, *521*, 87.
34. Bokesch, H. R.; Charan, R. D.; Meragelman, K. M.; Beutler, J. A.; Gardella, R.; O'Keefe, B. R.; Mckee, T. C.; Mc Mahon, J. B.; *FEBS Lett.* **2004**, *567*, 287.
35. Hernandez, J. F.; Gagnon, J.; Chiche, L.; Nguyen, T. M.; Andrieu, J. P.; Heitz, A.; Hong, T. T.; Pham, T. C.; Nguyen, D. L.; *Biochemistry* **2000**, *39*, 5722.
36. Heitz, A.; Hernandez, J. F.; Gagnon, J.; Hong, T. T.; Pham, T. T.; Nguyen, T. M.; Le-Nguyen, D.; Chiche, L.; *Biochemistry* **2001**, *40*, 7973.
37. Laskowski, M. J.; Kato, I.; *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 593.
38. Gaymes, T. G.; Bebrat, M.; Siemion, I. Z.; Kay, J. E.; *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 224.
39. Auvin-Guette, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Xavier, H. S.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11495.
40. Wang, C.; Zhang, L. L.; Lu, Y.; Zheng, Q. T.; Cheng, Y. X.; Zhou, J.; Tan, N. H.; *J. Mol. Struct.* **2004**, *688*, 67.
41. Morita, H.; Sato, Y.; Kobayashi, J.; *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7509.
42. Baraguey, C.; Blond, A.; Correia, I.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C.; *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 325.
43. Wélé, A.; Ndoye, I.; Zhang, Y.; Brouard, J. P.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; *Phytochemistry* (Elsevier) **2005**, *66*, 1154.
44. Wélé, A.; Landon, C.; Labbé, H.; Vovelle, F.; Zhang, Y.; Bodo, B.; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 405.
45. Hsieh, P. W.; Chang, F. R.; Wu, C. C.; Wu, K. Y.; Li, C. M.; Chen, S. L.; Wu, Y. C.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1522.
46. Morita, H.; Yun, Y. S.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Yamada, K.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6003.
47. Baraguey, C.; Auvin-Guette, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, *18*, 3033.
48. Baraguey, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, *17*, 2098.
49. Auvin-Guette, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Xavier, H. S.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11495.
50. Morita, H.; Kayashita, T.; Kobata, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Itokawa, H.; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6797.
51. Morita, H.; Kayashita, T.; Kobata, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Itokawa, H.; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9975.
52. Morita, H.; Kobata, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9975.
53. Morita, H.; Kayashita, T.; Shishido, A.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Shiro, M.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1165.
54. Morita, H.; Shishido, A.; Kayashita, T.; Takeya, K.; Itokawa, H.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 404.
55. Berg, A. J. J.; Horsten, S. F. A. J. A.; Kettenes-Van Den Bosch, J. J.; Kroes, B. H.; Beukelman, C. J.; Leeftang, B. R.; Labadie, R. P.; *FEBS Lett.* **1995**, *358*, 215.
56. Kosasi, S.; Sluis, W. G.; Boelens, R.; 'T Hart, L. A.; Labadie, R. P.; *FEBS Lett.* **1989**, *256*, 91.
57. Yun, Y. S.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 216.
58. Horsten, S. F. A. J.; Van Den Berg, A. J. J.; Kettenes-Van Den Bosch, J. J.; Leeftang, B. R.; Labadie, R. P.; *Planta Med.* **1995**, *62*, 46.
59. Wang, Y.C.; Tan, N.H.; Zhou, J.; Wu, H. M.; *Phytochemistry* (Elsevier) **1998**, *49*, 1453.
60. Zhao, Y. R.; Zhou, J.; Wang, X. K.; Huang, X. L.; Wu, H. M.; Zou, C.; *Phytochemistry* (Elsevier) **1995**, *40*, 1453.
61. Wélé, A.; Zhang, Y.; Caux, C.; Brouard, J. P.; Dubost, L.; Guette, C.; Pousset, J. L.; Badiane, M.; Bodo, B.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, *23*, 2712.
62. Wélé, A.; Zhang, Y.; Brouard, J. P.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; *Phytochemistry* (Elsevier) **2005**, *66*, 2376.
63. Horsten, S. F. A. J.; *Thesis Universiteit Utrecht*, Faculteit Farmacie, Sweden, 1995.
64. Przydzial, M. J.; Pogozheva, I. D.; Boose, K. E.; Andrews, S. M.; Thrap, T. A.; Traynor, J. R.; Mosberg, H. I.; *J. Pept. Res.* **2005**, *66*, 333.
65. Przydzial, M. J.; Pogozheva, I. D.; Ho, J. C.; Boose, K. E.; Sawyer, E.; Traynor, J. R.; Mosberg, H. I.; *J. Pept. Res.* **2005**, *66*, 255.
66. Auvin, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Lezenven, F.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2845.
67. Hsieh, P. W.; Chang, F. R.; Wu, C. C.; Wu, K. Y.; Li, C. M.; Wang, W. Y.; Gu, L. C.; Wu, Y. C.; *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 57.
68. Mongkolvisut, W.; Sutthivaiyakit, S.; Leutbecher, H.; Miika, S.; Klaiber, I.; Möller, H. R.; Beifuss, U.; Conrad, J.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1435.
69. Wélé, A.; Zhang, Y.; Ndoye, I.; Brouard, J. P.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1577.
70. Wélé, A.; Ndoye, I.; Zhang, Y.; Brouard, J. P.; Bodo, B.; *Phytochemistry* (Elsevier) **2005**, *66*, 693.
71. Wélé, A.; Zhang, Y.; Brouard, J. P.; Pousset, J. L.; Bodo, B.; *Phytochemistry* (Elsevier) **2005**, *66*, 2376.
72. Morita, H.; Kayashita, T.; Shimomura, M.; Takeya, K.; Itokawa, H.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 280.
73. Welker, M.; Von Döhren, H.; *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 530.
74. Marahiel, M. A.; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; *Chem. Rev.* (Washington, DC, U. S.) **1997**, *97*, 2651.
75. Cane, D. E.; Walsh, C. T.; Khosla, C.; *Science* (Washington, DC, U. S.) **1998**, *282*, 63.
76. Weber, G.; Schörgendorfer, K.; Schneider-Scherzer, E.; Leitner, E.; *Curr. Genet.* **1994**, *26*, 120.
77. Cheng, Y.-Q.; Walton, J. D.; *The J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4906.

78. Sieber, S. A.; Marahiel, M. A.; *Chem. Rev.* (Washington, DC, U. S.) **2005**, *105*, 715.
79. Kleinkauf, H.; Von Döhren, H.; *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 1.
80. Lipmann, F.; Gevers, W.; Kleinkauf, H.; Roskoski, R.; *Adv. Enzymol.* **1971**, *35*, 1.
81. Lipmann, F.; *Science* (Washington, DC, U. S.) **1971**, *173*, 875.
82. Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A.; *ChemBioChem* **2002**, *3*, 490.
83. Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A.; *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275.
84. Doekel, S.; Marahiel, M. A.; *Metab. Eng.* **2001**, *3*, 64.
85. Sieber, S. A.; Marahiel, M. A.; *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 7036.
86. Kleinkauf, H.; Von Döhren, H.; *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 335.
87. Moffitt, M. C.; Neilan, B. A.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *191*, 159.
88. Marahiel, M. A.; Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; *Chem. Rev.* (Washington, DC, U. S.) **1997**, *97*, 2651.
89. Chiu, H.-T.; Hubbard, B. K.; Shah, A. N.; Eide, J.; Fredenburg, R. A.; Walsh, C. T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 8548.
90. Ferra, F.; Rodriguez, F.; Tortora, O.; Tosi, C.; Grandi, G.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25304.
91. Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5848.
92. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235.
93. PDB ID: 1E68 - Gonzalez, C.; Langdon, G. M.; Bruix, M.; Galvez, A.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Rico, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11221.
94. PDB ID: 1HVZ - Trabi, M.; Schirra, H. J.; Craik, D. J.; *Biochemistry* **2001**, *40*, 4211.
95. PDB ID: 1IB9 - Felizmenio-Quimio, M. E.; Daly, N. L.; Craik, D. J.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22875.
96. PDB ID: 1PXQ - Kawulka, K. E.; Sprules, T.; Diaper, C. M.; Whittall, R. M.; McKay, R. T.; Mercier, P.; Zuber, P.; Vederas, J. C.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 3385.
97. Thennarasu, S.; Lee, D. K.; Poon, A.; Kawulka, K. E.; Vederas, J. C.; Ramamoorthy, A.; *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *137*, 38.
98. Seather, O.; Craik, D. J.; Campbell, I. D.; Sletten, K.; Juul, J.; D Norman, D. G.; *Biochemistry* **1995**, *34*, 4147.
99. PDB ID: 1PT4 - Jennings, C. V.; Rosengren, K. J.; Daly, N. L.; Plan, M.; Stevens, J.; Scanlon, M. J.; Waïne, C.; Norman, D. G.; Anderson, M. A.; Craik, D. J.; *Biochemistry* **2005**, *44*, 851.
100. Jaulent, A. M.; Brauer, A. B.; Matthews, S. J.; Leatherbarrow, R. J.; *J. Biomol. NMR* **2005**, *33*, 57. 101. PDB ID: 1JBL - Korsinczyk, M. L.; Schirra, H. J.; Rosengren, K. J.; West, J.; Condie, B. A.; Otvos, L.; Anderson, M. A.; Craik, D. J.; *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 579.
102. Craik, D. J.; Anderson, M. A.; Barry, G. G.; Clark R. J.; Daly, N. I.; Jennings, C. V.; Mulvenna, J.; *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 119.
103. Thomma, B. P. H. J.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K.; *Planta* **2002**, *216*, 193.
104. Rees, D. C.; Lipscomb, W. N.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 4633.
105. Semple, C. A.; Gautier, P. Taylor, K.; Dorin, J. R.; *Mol. Diversity* **2006**, *10*, 575.
106. Jennings, C.; West, J.; Waïne, C.; Craik, D.; Anderson, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 10614.
107. Terras, F. R.; Schoofs, H. M.; De Bolle, M. F.; Van Leuven, F.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P.; Broekaert, W. F.; *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15301.
108. Fant, F.; Vranken, W.; Broekaert, W.; Borremans, F.; *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 257.
109. Isaacs, N. W.; *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 391.
110. Trabi, M.; Craik, D. J.; *Plant Cell* **2004**, *16*, 2204.
111. Barry, D. G.; Daly, N. L.; Bokesch, H. R.; Gustafson, K. R.; Craik, D. J.; *Structure* (Cambridge, MA, U. S.) **2004**, *12*, 85.
112. Göransson, U.; Luijendijk, T.; Johansson, S.; Bohlin, L.; Claeson, P.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 283.
113. Claeson, P.; Göransson, U.; Johansson, S.; Luijendijk, T.; Bohlin, L.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 77.
114. Gustafson, K. R.; Sowder II, R. C.; Henderson, L. E.; Parsons, I. C.; Kashman, Y.; Cardellina II, J. H.; McMahon, J. B.; Buckheit Jr., R. W.; Pannell, L. K.; Boyd, M. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *113*, 9337.
115. Gustafson, K. R.; Walton, L. K.; Sowder II, R. C.; Johnson, D. G.; Pannell, L. K.; Cardellina II, J. H.; Boyd, M. R.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 176.
116. Witherup, K. M.; Bogusky, M. J.; Anderson, P. S.; Ramjit, H.; Ransom, R. W.; Wood, T.; Sardana, M.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1619.
117. Daly, N. L.; Gustafson, K. R.; Craik, D. J.; *FEBS Lett.* **2004**, *574*, 69.
118. Pelegrini, P. B.; Quirino, B. F.; Franco, O. L.; *Peptides* (N.Y., NY, U. S.) **2007**, *28*, 1475.
119. Svängård, E.; Göransson, U.; Smith, D.; Verma, C.; Backlund, A.; Bohlin, L.; Claeson, P.; *Phytochemistry* (Elsevier) **2003**, *64*, 135.
120. Hallock, Y. F.; Sowder II, R. C.; Pannell, L. K.; Hughes, C. B.; Johnson, D. G.; Gulakowski, R.; Cardellina II, J. H.; Boyd, M. R.; *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 124.
121. Broussalis, A. M.; Göransson, U.; Coussio, J. D.; Ferraro, G.; Martino, V.; Claeson, P.; *Phytochemistry* (Elsevier) **2001**, *58*, 47.
122. Bokesch, H. R.; Pannell, L. K.; Cochran, P. K.; Sowder 2nd, R. C.; Mckee, T. C.; Boyd, M. R.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 249.
123. Rosengren, K. J.; Daly, N. L.; Plan, M. R.; Waïne, C.; Craik, D. J.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8606.
124. Colgrave, M. L.; Craik, D. J.; *Biochemistry* **2004**, *43*, 5965.
125. Tam, J.; Lu, Y. A.; Yang, J. L.; Chiu, K. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 8913.
126. Kamimori, H.; Hall, K.; Craik, D. J.; Aguilar, M. I.; *Anal. Biochem.* **2005**, *337*, 149.
127. Shenkarev, Z. O.; Nadezhdin, K. D.; Sobol, A. G.; Skjeldal, L.; *FEBS J.* **2006**, *273*, 2658.
128. Lindholm, P.; Göransson, U.; Johanson, S.; Cleason, P.; Gullbo, J.; Larsson, R.; Bohlin, L.; Backlund, A.; *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 365.
129. Gran, L.; *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1973**, *33*, 400.
130. Schöpke, T.; Hasan Agha, M.; Kraft, R.; Otto, A.; Hiller, K.; *Sci. Pharm.* **1993**, *61*, 145.
131. Svängård, E.; Göransson, U.; Hocaoglu, Z.; Gullbo, J.; Larsson, R.; Claeson, P.; Bohlin, L.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 144.
132. Pavela-Vrancic, M.; Van Liempt, H.; Freist, W.; Von Döhren, H.; *Eur. J. Biochem.* **1994**, *220*, 535.
133. Camarero, J. A.; Kimura, R. H.; Woo, Y.-H.; Shekhtman, A.; Cantor, J.; *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1363.
134. Emrich, R.; *J. Plant Physiol.* **2003**, *16*, 727.
135. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; *Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company: New York, 2002.
136. Kimura, R.; Krishna, K.; Camarero, J. A.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *118*, 987.
137. Dutton, J. L.; Renda, R. F.; Waïne, C.; Clark, R. J.; Daly, N. L.; Jennings, C. V.; Anderson, M. A.; Craik, D. J.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46858.
138. Gunasekera, S.; Daly, N. L.; Anderson, M. A.; Craik, D. J.; *IUBMB Life* **2006**, *58*, 515.
139. Rotari, V. I.; Dando, P. M.; Barrett, A. J.; *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 953.
140. Daly, D. C.; Cameron, H. M.; Stevenson, P. M.; *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 1328.
141. Craik, D. J.; Čemažar, M.; Wang, C. K. L.; Daly, N. L.; *Biopolymers* **2006**, *84*, 250.
142. Seydel, P.; Gruber, C. W.; Craik, D. J.; Dörnenburg, H.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *77*, 275.
143. Camarero, J. A.; Muir, T. W.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, *121*, 5597.