

## **CAPÍTOL 5**



## LÍNIES DE FUTUR

---

En els capítols anteriors s'ha descrit la part principal del treball realitzat durant aquests anys. D'altra banda, però, també s'han començat a realitzar i a plantejar altres estudis que en un futur poden servir com a orientació per tal de continuar amb aquest treball. A continuació hi ha descrites aquestes línies de futur.

### Assaigs *in vivo*

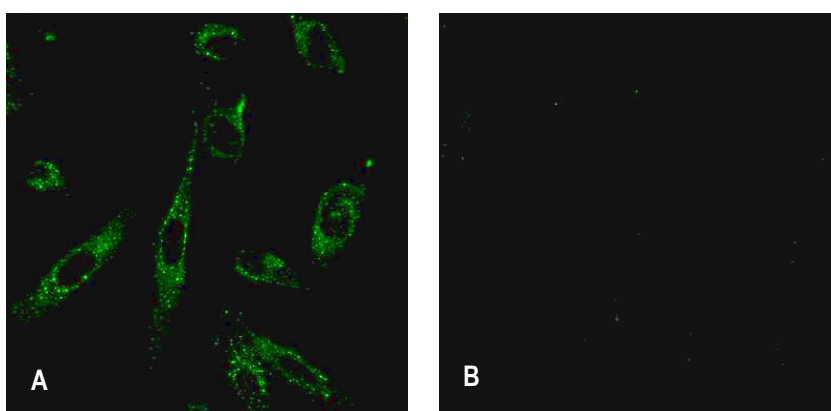
Considerant l'elevada afinitat que s'ha trobat entre la p53\_tetS i el pèptid Candidat 4 i alguns altres pèptids de la quimioteca, ha semblat molt interessant assajar si aquests pèptids són capaços d'interaccionar amb la p53 *in vivo*.

Com a etapa prèvia a l'anàlisi de si es produeix algun efecte relacionat amb la p53 en tractar cèl·lules amb algun d'aquests pèptids ha semblat més adient assajar la capacitat d'aquests pèptids de

creuar membranes cel·lulars. Així doncs, aprofitant l'experiència del nostre grup en aquest camp<sup>172</sup> s'ha decidit comprovar si el pèptid CF-Candidat 4 és capaç de creuar la membrana de cèl·lules tipus Hela.

Per fer aquests assaigs, s'ha utilitzat el pèptid Candidat 4 amb carboxifluoresceïna (CF) en l'extrem N-terminal, perquè així es pot avaluar la internalització del pèptid mitjançant fluorescència.

Així doncs, s'ha analitzat la internalització del pèptid CF-Candidat 4 a diferents concentracions, temps i temperatures<sup>173</sup>. A partir d'aquests assaigs s'ha pogut concloure que el pèptid Candidat 4 és capaç de creuar la membrana cel·lular (figura 5.1). Pel que fa al mecanisme, sembla ser que aquest és mitjançant endocitosis, ja que a 37°C es produeix internalització però a 4°C no.



**Figura 5.1** A- Cèl·lules Hela + CF-Candidat 4 50 $\mu$ M 1h 37°C B- Control negatiu (cèl·lules Hela + CF 50 $\mu$ M 3h 37°C).

També s'ha avaluat la viabilitat de les cèl·lules, comprovant-se que a aquestes concentracions el pèptid Candidat 4 no presenta toxicitat.

Així doncs, es pot concloure que aquest pèptid és un bon candidat per dur a terme assaigs *in vivo* d'interacció amb la p53.

Tenint en compte els treballs descrits en la bibliografia, no ha de sorprendre que el pèptid Candidat 4 sigui capaç de creuar la membrana cel·lular, ja que aquest és un pèptid ric en arginines i que presenta una clara amfipaticitat (figura 5.2), factors que s'ha vist que poden afavorir el creuament de membranes<sup>174</sup>.

<sup>172</sup> Fernández-Carneado, J., Kogan, M.J., Castel, S. & Giralt, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2004), *in press*

<sup>173</sup> Assaigs realitzats per la Dra. Jimena Fernández Carneado.

<sup>174</sup> Fernández-Carneado, J., Kogan, M.J., Pujals, S. & Giralt, E., *Biopolymers (Pept. Sci)*, (2004), *in press*



**Figura 5.2** Representació de l'amfipaticitat del pèptid CF-Candidat 4.

En la bibliografia, també hi ha treballs que comparen la internalització de pèptids rics en arginina amb pèptids en els quals s'ha substituït l'arginina per anàlegs amb diferent longitud de la cadena lateral<sup>175</sup>. En aquests treballs s'ha comprovat que mitjançant la utilització d'aquests anàlegs es manté la capacitat de creuar membranes dels corresponents pèptids, fet que fa pensar que probablement els pèptids més afins de la quimioteca (Rab4 i Rys2R2), també són uns bons candidats per dur a terme estudis *in vivo*.

### Generació de novo de lligands

En aquest treball s'ha presentat el disseny, síntesi i avaluació d'una sèrie de pèptids els quals estan inspirats en el compost tetraguanidínic. Una altra alternativa, però, hauria pogut ser la preparació de quimiotèques menys dirigides en les quals es donés total llibertat a la naturalesa de cada aminoàcid de la seqüència. Com ja s'ha esmentat en el capítol 4, aquest tipus d'aproximació implicaria la generació d'un gran nombre de pèptids i per tant s'haurien de preveure altres eines per tal de poder-ne dur a terme l'avaluació.

Així doncs, s'han començat a explorar dues alternatives per poder realitzar aquest tipus d'estudi:

- a) **Utilització de quimiotèques “one bead-one compound”.** Per tal de poder-ne dur a terme una avaluació directament en fase sòlida, en aquest treball s'han obtingut dos anticossos dirigits a diferents regions de la p53\_tetS (Apèndix).
- b) **Generació i avaluació *in silico*.** En aquest sentit, s'ha començat a explorar la utilització de l'Autodock en l'avaluació dels pèptids dissenyats en aquest treball. A més a més, també s'ha començat a explorar la utilització de programes basats en algorismes genètics per tal de generar i avaluar nous pèptids<sup>176</sup>.

### Ampliació de la zona de reconeixement

L'objectiu inicial d'aquesta tesi era reconèixer el motiu tetraaniònic de la superfície del domini de tetramerització de la p53 format pels residus E343, E346, E349 i D352. Tal i com ja s'ha explicat, els

<sup>175</sup> Mitchell, D.J., Kim, D.T., Steinman, L., Fathman, C.G. & Rothbard, J.B., *J. Peptide Res.*, (2000), **56**, 318-325

<sup>176</sup> Treball realitzat conjuntament amb Ignasi Belda.

pèptids que s'han obtingut, tot i que interaccionen amb elevada afinitat amb la p53\_tetS, sembla que no ho fan exactament en el motiu tetraaniònic format per aquests quatre residus, sinó que ho fan amb la zona rica en carboxilats de la superfície de la proteïna en la qual també hi ha els residus E336 i E339. Aquest resultat posa de manifest que potser seria possible utilitzar lligands amb més de quatre arginines per tal de reconèixer simultàniament més carboxilats de la superfície de la p53\_tetS.

### Utilització de lligands polivalents

En la bibliografia, s'hi poden trobar força exemples que il·lustren com en els casos en els quals el receptor disposa de diferents zones d'unió equivalents, es pot augmentar moltíssim l'afinitat d'un lligand mitjançant la utilització de versions polivalents del mateix<sup>177</sup>. En general, aquest augment d'afinitat és molt més gran que la suma de les afinitats de cada unitat de lligand, gràcies principalment a la millora del component entròpic de la interacció<sup>178</sup>. Així, en el disseny d'aquests tipus de lligands, és especialment important l'elecció de l'estructura a utilitzar per unir les diferents unitats del lligand, ja que la utilització d'estructures excessivament flexibles pot arribar a produir lligands amb un afinitat fins i tot inferior.

Considerant la simetria de la p53\_tetS i tenint en compte que s'ha comprovat que aquesta interacciona amb més d'una unitat de Candidat 4, sembla molt atractiva la idea d'utilitzar lligands basats en la utilització de varies unitats del pèptid Candidat 4 o dels altres pèptids que també han donat bons resultats.

### Pertorbació d'interaccions p53-proteïna

Un dels principals objectius del reconeixement de superfícies proteïques, és el de poder trobar lligands que siguin capaços de modular la funció d'una determinada proteïna mitjançant la pertorbació o la simulació de contactes proteïna-proteïna.

En el context de la p53, aquesta és una possibilitat molt atractiva ja que aquesta, per realitzar la seva funció, interacciona amb un elevadíssim nombre de proteïnes així com amb l'ADN<sup>179</sup>. Pel que fa el domini de tetramerització, s'ha comprovat que interacciona directament amb algunes proteïnes, com per exemple la "casein kinase II", la "protein kinase C" i la proteïna d'adenovirus E4orf6<sup>180</sup>. A més a més, aquest domini s'ha vist que pot ser clau també en la interacció amb d'altres proteïnes i amb l'ADN.

---

<sup>177</sup> Fan, E., Zhang, Z., Minke, W.E., Hou, Z., Verlinde, C.L.M.J. & Hol, W.G.J., *J. Am. Chem. Soc.*, (2000), **122**, 2663-2664

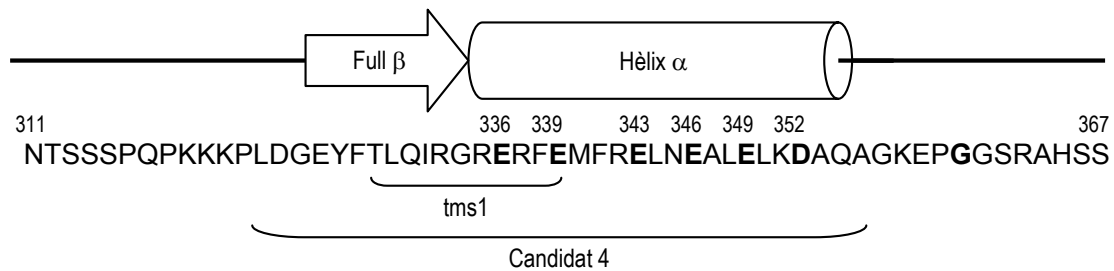
Thoma, G., Duthaler, R.O., Magnani, J.L. & Patton, J.T., *J. Am. Chem. Soc.*, (2001), **123**, 10113-10114

<sup>178</sup> Mammen, M., Choi, S. & Whitesides, G.M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (1998), **37**, 2754-2794

<sup>179</sup> Prives, C. & Hall, P.A., *J. Pathol.*, (1999), **187**, 112-126

<sup>180</sup> Chène, P., *Oncogene*, (2001), **20**, 2611-2617

Així doncs, podria ser molt interessant estudiar com afecten els pèptids obtinguts en aquest treball a la interacció amb totes aquestes proteïnes. Especialment interessant és el cas de la interacció amb la proteïna tms1, la qual s'ha pogut detectar en llevats. En aquest cas la p53 interacciona a través dels residus 330-339 els quals queden molt propers a la zona de reconeixement del pèptid Candidat 4 (figura 5.3)<sup>181</sup>, i per tant aquest seria un molt bon model per comprovar si els pèptids obtinguts són capaços d'afectar contactes p53-proteïna.



**Figura 5.3** Comparació de la zona de la p53\_tetS que interacciona amb la proteïna tms1, amb la zona involucrada en la interacció amb el pèptid Candidat 4.

Mitjançant anticossos policlonals dirigits a la tms1, s'ha pogut detectar en humans una proteïna de 42KDa molt similar que interacciona amb la p53 en el nucli<sup>182</sup>.

#### Interacció amb mutants de la p53 tetS

Una altra aplicació de creixent interès es basa en la utilització de lligands dirigits a proteïnes que, degut a algun tipus de mutació, tenen una estabilitat menor de l'habitual i en conseqüència pateixen una pèrdua de funcionalitat. Mitjançant la utilització de lligands que interaccionin selectivament amb la forma estructurada de la proteïna, es pot desplaçar l'equilibri entre la forma estructurada i la desestructurada de manera que s'augmenta l'estabilitat de la proteïna i per tant, se'n recupera la funcionalitat<sup>183</sup>. De fet, aquesta aplicació s'ha utilitzat amb èxit per a mutants del domini enllaçant de DNA de la p53<sup>184</sup>.

Així doncs, l'estudi de l'estabilitat del domini de tetramerització, tant natiu com versions mutades d'aquest, en presència dels pèptids preparats pot ser de gran utilitat. En aquest sentit, és especialment interessant estudiar com aquests pèptids afecten l'estabilitat de mutants en els quals s'ha comprovat que hi ha una reducció de l'estabilitat del domini de tetramerització. Entre els casos de càncer que

<sup>181</sup> Wagner, P., Fuchs, A., Prowald, A., Montenarh, M. & Nastainczyk, W., *FEBS Let.*, (1995), **377**, 155-158

<sup>182</sup> Appel, K., Schneider, E., Wagner, P., Höög, J.-O., Karlsson, C. & Montenarh, M., *Int. J. Oncol.*, (1994), **5**, 667-673

<sup>183</sup> Bullock, A.N. & Fersht, A.R., *Nat Cancer Rev.*, (2001), **1**, 68-76

<sup>184</sup> Friedler, A., Hansson, L.O., Veprintsev, D.B., Freund, S.M.V., Rippin, T.M., Nikolova, P.V., Proctor, M.R., Rüdiger, S. & Fersht, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2002), **99**, 937-942

presenten aquests tipus de mutacions, per exemple hi trobem el carcinoma adrenocortical (ACC) en nens (R337H)<sup>185</sup> i els síndromes Li-Fraumeni (L344P) i Li-Fraumeni-like (R337C)<sup>186</sup>.

### Reconeixement d'altres proteïnes

Per últim, aquest treball ha posat de manifest que a l'hora de dissenyar lligands per a superfícies proteïques és molt important considerar la plasticitat i flexibilitat tant del lligand com de la pròpia superfície. De fet, s'ha pogut comprovar que aquests pèptids poden ser útils per a reconèixer superfícies riques en carboxilats encara que aquests no estiguin distribuïts en una periodicitat de  $i / i+3$ .

Així doncs, una altra alternativa que ofereixen els pèptids preparats és la possibilitat que puguin ser utilitzats per reconèixer altres superfícies proteïques riques en carboxilats.

---

<sup>185</sup> DiGiammarino, E.L., Lee, A.S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R.C. et al., *Nat. Struct. Biol.*, (2002), **9**, 12-16

<sup>186</sup> Davison, T.S., Yin, P., Nie, E., Kay, C. & Arrowsmith, C.H., *Oncogene*, (1998), **17**, 651-656







## **CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONS

---

A partir dels resultats presentats en aquest treball se'n poden treure les següents conclusions:

- 1- S'ha posat a punt la metodologia necessària per expressar i purificar, en el nostre laboratori, el domini de tetramerització de la p53, amb marcatge isotòpic de  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ , i amb rendiments força bons (15-20mg. de proteïna per litre de cultiu). A més a més, s'han establert les eines necessàries per poder comprovar la integritat química i estructural de la proteïna.
- 2- Mitjançant modelat molecular, s'ha dissenyat un pèptid amb quatre arginines el qual és capaç de reconèixer el domini de tetramerització de la p53. El pèptid, anomenat Candidat 4, té la següent seqüència: Ac-A-G-A-A-G-W-A-R-G-R-A-R-S-R-NH<sub>2</sub>.
- 3- La interacció entre el pèptid Candidat 4 i el domini de tetramerització de la p53, s'ha estudiat mitjançant diferents tècniques independents, com són la ressonància magnètica nuclear, la ressonància de plasmó superficial, l'espectroscòpia de fluorescència i la microcalorimetria. A partir d'aquest estudis, es pot concloure que el Candidat 4 interacciona amb la p53<sub>tetS</sub> amb una estequeometria pèptid:proteïna de n:1, on  $n > 1$ . També s'ha comprovat que l'afinitat

disminueix a mesura que s'hi van incorporant noves unitats de pèptid, podent-se diferenciar dos tipus de constants, unes d'elevada afinitat ( $K_D \approx 10\mu\text{M}$ ) i unes altres de baixa afinitat ( $K_D \approx 1\text{mM}$ ).

- 4- Pel que fa a la zona de reconeixement, a partir de les dades de RMN s'ha comprovat que el pèptid Candidat 4 interacciona amb la zona rica en carboxilats de la superfície del domini de tetramerització de la p53, encara que probablement, no reconeix exclusivament el motiu tetraaniònic format pels residus E343, E346, E349 i D352.
- 5- S'ha pogut comprovar que mitjançant pèptids rics en arginina com el Candidat 4, es poden obtenir lligands amb una afinitat pel domini de tetramerització de la p53, superior a la del compost tetraguanidínic 1.
- 6- Considerant les constants d'afinitat dels sistemes estudiats, s'ha pogut establir l'espectroscòpia de fluorescència, com la millor metodologia per avaluar en solució la interacció entre el domini de tetramerització de la p53 i lligands peptídics amb triptòfan.
- 7- Prenent com a punt de partida el pèptid Candidat 4, s'ha dissenyat i preparat una quimioteca de 40 pèptids basada, principalment, en la substitució de les ariginines per altres residus. A partir dels resultats obtinguts en l'avaluació de la interacció del domini de tetramerització de la p53 amb cadascun dels membres de la quimioteca, es pot concloure que s'han obtingut quatre pèptids amb una afinitat clarament superior a la del Candidat 4 i disset pèptids amb una afinitat similar. És de destacar el cas del pèptid Rab4, en el qual s'han substituït les quatre arginines per anàlegs de cadena lateral més curta. Per aquest pèptid, s'ha pogut determinar una constant d'afinitat pràcticament un ordre de magnitud superior a la del Candidat 4 ( $K_D \approx 1\mu\text{M}$ ). Aquests resultats posen de manifest la utilitat de la química combinatòria com a eina per optimitzar lligands peptídics de superfícies proteiques.
- 8- A partir dels resultats obtinguts en l'avaluació de la quimioteca, s'ha comprovat que el reconeixement entre els pèptids sintetitzats i el domini de tetramerització de la p53 és fonamentalment de caràcter electrostàtic, tot i que també s'ha posat de manifest la importància de la contribució del triptòfan així com la d'un cert component hidrofòbic. A més a més, s'ha comprovat que els lligands poliguanidínics són més efectius que els lligands poliamònics a l'hora de reconèixer la zona rica en carboxilats de la superfície del domini.
- 9- A partir d'aquests resultats també s'ha posat de manifest la conveniència d'utilitzar tècniques de modelat molecular per al disseny de lligands de superfícies proteiques que presentin una afinitat elevada. D'altra banda, s'ha comprovat que en aquest disseny s'ha de tenir en compte

que el lligand ha de tenir la suficient flexibilitat per poder-se adaptar a zones d'elevada plasticitat i mobilitat com són les superfícies proteiques.

- 10- S'ha comprovat que el pèptid Candidat 4 té la capacitat de creuar la membrana cel·lular, fet que obre les portes a poder avaluar si és capaç de reconèixer la p53 *in vivo*.

