



**USE OF CALIX[4]ARENES TO  
RECOVER THE SELF-ASSEMBLY  
ABILITY OF MUTATED p53  
TETRAMERIZATION DOMAINS**

**Susana Gordo Villoslada**

**2008**

Memòria presentada per

Susana Gordo Villoslada

per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Revisada per:

Prof. Ernest Giralt i Lledó

Universitat de Barcelona

Director

Programa de Química Orgànica

Bienni 2003-2005

Barcelona, abril de 2008

# RESUMEN

## CONTENIDOS

<b>Introducción</b> .....	<b>283</b>
Objetivos .....	288
<b>Resultados</b> .....	<b>289</b>
1. El dominio de tetramerización de p53 y sus mutantes .....	289
2. Calix4bridge: un ligando diseñado para el dominio de tetramerización de p53 .....	292
3. Calix4prop: un ligando inesperado para el dominio de tetramerización de p53 .....	295
4. Otras propiedades de reconocimiento molecular de los compuestos calixareños .....	298
Líneas de Futuro .....	299
<b>Conclusiones</b> .....	<b>301</b>



# INTRODUCCIÓN

## En la red de contactos de las proteínas

Las proteínas constituyen el motor de los organismos vivos, llevando a cabo multitud de funciones que van desde el mero soporte físico hasta el control del ciclo celular. Sin duda alguna, semejante variedad funcional es solo posible gracias al amplio abanico de interacciones que las proteínas pueden establecer, ya sea entre ellas o con otras biomoléculas.

Las interacciones proteína-proteína se encuentran organizadas en *redes* extremadamente complejas, donde cada proteína se representa como un *nodo* y cada interacción, como un *eje*. Las proteínas *esenciales* se caracterizan por presentar cientos de conexiones; dicho grado de conectividad se ve reflejado en la flexibilidad estructural de la proteína.

Cada función tiene una óptima afinidad y una determinada duración, de modo que la evolución no siempre favorece aquellas interacciones fuertes y son muchos los casos de débiles interacciones transitorias. Precisamente por éste motivo, resulta complejo establecer generalidades sobre la interfaz de los complejos proteína-proteína, pues cada sistema ha adoptado diferentes soluciones para satisfacer sus necesidades de especificidad y afinidad.

La especificidad entre dos proteínas se deriva de la complementariedad física y química de las interfaces. En general, dichas interfaces son circulares, planas, y se extienden entorno a los 1500Å. La extensión no es proporcional a la energía de unión; tan solo unos pocos residuos, los llamados “puntos calientes”, son los que en realidad contribuyen a estabilizar energéticamente el complejo. No obstante, puesto que no todas las interacciones proteína-proteína deben ser fuertes, no todas las interfaces presentan dichos puntos de anclaje.

Normalmente, las interfaces son más hidrofóbicas que las superficies externas de las proteínas pero más hidrofílicas que sus interiores. De hecho, los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina, y la arginina son los residuos más frecuentes. Aunque las interacciones hidrofóbicas son muy importantes, no hay que pasar por alto la contribución de los puentes de hidrogeno y las interacciones electrostáticas.

La reorganización estructural también juega un papel muy importante en la interacción entre proteínas, puesto que la conformación de la proteína puede actuar por si misma como un mecanismo de regulación.

## Problemas en la red

Para el correcto desarrollo de un organismo, su red de interacciones proteína-proteína debe funcionar a la perfección; de no ser así, se produciría un fallo en el sistema que acarrearía nefastas consecuencias, conduciendo al desarrollo de algún tipo de patología.

Exógenos o endógenos, muchos son los factores que pueden perturbar la armonía de la red y originar “agujeros” (pérdida de función) o “nudos” (aumento o ganancia de función). Bien conocidos son, por ejemplo, las infecciones por virus o bacterias. En muchas otras ocasiones, el malfuncionamiento reside en el propio organismo; tal es el caso de las mutaciones génicas y las muy numerosas enfermedades asociadas a ellas.

Mutaciones en la secuencia de una proteína pueden alterar su red de contactos, ya sea evitando interacciones existentes o promoviendo otras nuevas. La mutación puede afectar directamente a la interfaz, pero también puede tocar otros residuos distantes necesarios para la correcta estructura o localización.

Las mutaciones, sin embargo, no son el único mecanismo endógeno que puede perturbar la red. Otro caso muy notorio son los desordenes asociados al incorrecto plegamiento de las proteínas. Mutada o no, una proteína mal plegada también puede dar lugar a agujeros en la red. Y lo que es peor, con frecuencia se encuentra que las proteínas mal plegadas se acumulan en forma de agregados (fibrillas amiloides, por ejemplo) que resultan tóxicos e incluso letales.

## **Manipulando la red**

Entender cuando y por qué falla la red de interacciones proteína-proteína es de incalculable valor para el desarrollo de una estrategia terapéutica. Ver el problema en la red y no en el individuo (la proteína) expande las posibilidades en el desarrollo de fármacos.

Diseñar fármacos en base a las interacciones proteína-proteína es ardua tarea. Muchos son los desafíos que se presentan, pues las interfaces son de naturaleza muy diversa, grandes, planas, sin ningún rasgo distintivo, están apantalladas por las moléculas del medio y pueden ser conformacionalmente flexibles o presentar modificaciones post-transcripcionales transitorias. Además, desarrollar ensayos biológicos para evaluar interacciones proteína-proteína no es siempre posible; con frecuencia es necesario recurrir a técnicas biofísicas que no siempre pueden reproducir fielmente las condiciones *in vivo*. Posiblemente, por todos estos escollos las interacciones proteína-proteína han permanecido inexploradas e inexploradas hasta el momento.

Conceptualmente es mucho más fácil inhibir que estimular o restaurar una actividad, y prueba de ello es el volumen de trabajo publicado al respecto. Muchas son las estrategias a seguir para el diseño de inhibidores de interfaces, como por ejemplo, anticuerpos artificiales, proteínas miniatura, peptidomiméticos, proteomiméticos, exploraciones masivas de compuestos naturales o sintéticos, diseño computacional, *etc.* Con respecto al diseño de estabilizadores pocos casos se han descrito, siendo los más comunes aquellos orientados a dimerizar receptores de membrana.

En las patologías asociadas al incorrecto plegamiento de la proteína y su posible agregación, se siguen otras estrategias. Por una parte se puede intentar inhibir directamente el proceso de agregación. Por otra parte, se puede afrontar el problema desde su origen, ayudando a que la proteína se plegue correctamente, lo que se conoce como la “estrategia de las chaperonas”. En particular, se está prestando especial atención a las llamadas *chaperonas farmacológicas*; se trata

de pequeñas moléculas o pépticos que se unen al estado nativo de la proteína desplazando de este modo el equilibrio de plegamiento hacia la forma correcta.

### **Proteína p53: el ejemplo**

La proteína supresora de tumores p53 es un excelente ejemplo que ilustra cuan de importante son las interacciones proteína-proteína, las adversas consecuencias que se derivan de su mal funcionamiento y las estrategias que se pueden seguir para repararlas.

La actividad de p53 se encuentra alterada en casi el 60% de tumores humanos, lo que pone de manifiesto su papel central en la red de proteínas. En el 90% de los casos, la disfunción de p53 tiene su origen en la mutación de la proteína. En el 10% restante, el problema se origina en la red de contactos más inmediata a p53, siendo lo más frecuente alteraciones en MDM2, proteína que interacciona y regula la degradación de p53. Algunos casos de virus capaces de inactivar p53 también se han descrito (por ejemplo, el del papiloma humano).

Multitud de estrategias se han propuesto para la recuperación o amplificación de la función de p53, desde la terapia génica, pasando por la inhibición de su interacción con MDM2, hasta el diseño de chaperonas farmacológicas que permiten recuperar mutantes no estructurados.

### **Multivalencia y calixarenos**

No siempre es posible diseñar pequeñas moléculas capaces de reconocer amplias superficies proteicas. Nuevas estrategias de diseño han llevado al desarrollo de ligandos mucho más grandes –lejos del clásico concepto de fármaco–, capaces de cubrir extensiones mayores y capaces de unirse a la superficie de la proteína por múltiples puntos de anclaje. Se aprovecha así el conocido concepto de *multivalencia*, donde múltiples interacciones simultáneas resultan globalmente en una mayor afinidad. Normalmente estos ligandos están compuestos por una plataforma central (el “*scaffold*”) de donde sobresalen multitud de grupos funcionales diseñados específicamente para reconocer rasgos particulares de la proteína.

Entre los casos más destacados de plataformas multivalentes, hay que destacar los versátiles y prometedores calixarenos. Los calix[*n*]arenos son macrociclos sintéticos que resultan de la condensación de fenol y formaldehído, derivando en estructuras cíclicas de 4 a 8 unidades aromáticas. El borde bajo o estrecho (“*lower*” o “*narrow rim*”) queda definido por el grupo fenol y el borde alto o ancho (“*upper*” o “*wide rim*”) contiene las posiciones *para* del anillo aromático. Ambos son excelentes puntos para la introducción de funcionalidad y diversidad, y muchos son los ejemplos que demuestran sus múltiples aplicaciones.

## Métodos biofísicos

Para la caracterización de las superficies proteicas y sus interacciones con otras proteínas o ligandos no es siempre posible disponer de ensayos biológicos. En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de técnicas biofísicas para el estudio de estas interacciones. A continuación se hace una breve mención de aquellas aplicadas en la presente tesis.

### Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es el mejor método conocido para determinar estructuras tridimensionales con resolución atómica de macromoléculas biológicas en disolución. Aun así, actualmente, su mayor aplicación es la caracterización de interacciones proteína-proteína y proteína-ligando. Además de la estructura, también es posible determinar la termodinámica, la cinética y el mecanismo de la interacción.

Las propiedades magnéticas de un núcleo son extremadamente sensibles al medio que le rodea y por tanto, a la interacción entre moléculas. Muchos son los parámetros en RMN que se pueden utilizar como *sondas* de la interacción, tanto desde el punto de vista de la macromolécula (el receptor) como el ligando.

El experimento por anisotropía basado en la detección del receptor es el conocido como *perturbación de desplazamiento químico*, que consiste en detectar los cambios que experimentan las resonancias de la proteína en presencia del ligando. Normalmente se realiza en experimentos 2D ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ó  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) con proteína marcada isotópicamente, y permite localizar el lugar de unión del ligando.

Los experimentos basados en el ligando, más numerosos, aprovechan aquellas propiedades que dependen de la masa aparente pues, en el complejo, el pequeño ligando pasa a comportarse como una gran macromolécula. La mayoría de los experimentos se basan en los cambios de la relajación transversal (T2) y del nOe (*nuclear Overhauser effect*) transferido. Hay que destacar, también, los experimentos de diferencia de saturación transferida (STD) que permiten localizar la zona de unión en el ligando.

### Cristalografía de rayos X

La técnica por excelencia para determinar estructuras de proteínas y de sus complejos pasa por la difracción de rayos X de la especie cristalizada.

En el caso particular de los complejos proteína-ligando se pueden seguir dos estrategias para la obtención de la coestructura. La primera consiste en sumergir cristales preformados de proteína en una solución que contenga ligando (*crystal soaking*), con la esperanza que el ligando se difunda por los canales de la red cristalina y se coloque en su lugar de interacción. La segunda, implica cocristalizar directamente el complejo. Cada una de las estrategias tiene sus



inconvenientes (a cual peor) y, finalmente, puede resultar que la estructura cristalizada no represente al complejo en solución.

### **Dicroísmo Circular (CD)**

Esta técnica espectroscopia permite determinar elementos de estructura secundaria (e incluso terciaria) en proteínas. Para el estudio de interacciones proteína-ligando se aprovechan los cambios que puede experimentar la estructura de la proteína debido a la unión. Adicionalmente, también es posible monitorizar cambios en el espectro en función de la temperatura o el tiempo.

### **Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

La calorimetría diferencia de barrido es actualmente la técnica más potente para la caracterización directa de la estabilidad térmica de una proteína. Cuando la estructura nativa de la proteína interacciona con un ligando, la biomolécula experimenta una estabilización térmica que tiene su origen en la energía adicional necesaria para separar el ligando unido antes que la proteína pueda desplegarse. Por tanto, cambios en el perfil de DSC son una prueba evidente de la existencia de interacción y además permiten caracterizar (de manera indirecta) la interacción proteína-ligando.

### **Calorimetría Isotérmica de Titulación (ITC)**

La calorimetría isotérmica de titulación mide directamente el calor puesto en juego cuando interaccionan dos moléculas. Puesto que todo proceso químico bimolecular implica una evolución energética, la ITC podría considerarse una técnica universal. El experimento en cuestión consiste en la inyección de micro-volumenes de ligando en una solución de proteína y el registro del calor absorbido o liberado. A partir de los datos experimentales se puede caracterizar completamente la termodinámica de la interacción, conocer mecanismos de reacción y sus fuerzas conductoras.

### **Espectrometría de Masas con Ionización por ElectroSpray (ESI-MS)**

La detección de complejos no covalentes por espectrometría de masas ha ganado popularidad en los últimos años. En cuestión de segundos, con poca muestra y sin necesidad de conocimientos sobre los componentes, se puede saber si interaccionan y en qué estequiometría. Para la generación de iones del complejo en fase gas, es necesaria una técnica suave como es el caso del electrospray.

## Objetivos

Las interacciones proteína-proteína son esenciales en muchos procesos biológicos y por ello resultan dianas terapéuticas muy prometedoras. Sin embargo, éste es un campo muy novel y modular artificialmente complejos proteicos resulta todavía un gran reto. Hasta la fecha, los esfuerzos se han dirigido básicamente hacia la inhibición de interacciones proteína-proteína; pocos precedentes describen el diseño de moléculas que puedan inducir, estabilizar o recuperar el estado oligomérico de proteínas. En relación a lo último, el sistema formado por el dominio de tetramerización de la proteína p53 y sus mutantes oncogénicos con oligomerización defectuosa se presenta como un excelente modelo para el diseño y la evaluación de moléculas que puedan recuperar el estado tetramérico nativo.

Trabajos previos en el grupo mostraron que compuestos oligocicloguanidínicos lineales y péptidos lineales con múltiples argininas podían reconocer un motivo polianiónico de carboxilatos en la superficie del dominio de tetramerización de p53. Dichos compuestos, sin embargo, únicamente eran capaces de interactuar individualmente con monómeros y por tanto, no tendría capacidad para mantener unidas las cuatro unidades del tetrámero.

En base a las propiedades de reconocimiento molecular del grupo guanidinio y considerando la estructura de la proteína, el Prof. Javier de Mendoza (ICIQ) diseñó racionalmente ligandos calix[4]arenos multivalentes capaces de interactuar simultáneamente con varios monómeros de la proteína y que, por tanto, pondrían estabilizar la agrupación tetramérica.

De este modo, los objetivos propuestos para la presente tesis han sido:

1. **Obtener mutantes naturales del dominio de tetramerización de p53** con oligomerización defectuosa y establecer la mejor metodología para su **caracterización estructural**.
2. Probar las **habilidades de reconocimiento molecular de los ligandos calix[4]arenos**:  
¿Pueden interactuar con el dominio de tetramerización de p53 tal y como se diseñaron?  
¿Pueden interactuar con el dominios de tetramerización mutados? ¿Cómo es la interacción? ¿Pueden estabilizar la estructura tetramérica?

# RESULTADOS

## 1. El dominio de tetramerización de p53 y sus mutantes

### 1.1. ¿Quiénes son?

El dominio de tetramerización de la proteína p53 (p53TD) corresponde al fragmento comprendido entre E326 y K357. Su estructura es bien conocida; cada monómero consta de una hebra  $\beta$  (326-333), unida a una hélice  $\alpha$  (335-357) a través de un giro muy cerrado (G334). Dos de estos monómeros interaccionan antiparalelamente, y dos de los dímeros resultantes interaccionan ortogonalmente para ensamblar el tetrámero final. Se trata de una estructura muy compacta, donde el efecto hidrofóbico es la mayor fuerza estabilizante de la interacción no covalente.

Sus características tan peculiares de tamaño, estructura y estabilidad, junto con su relevancia biológica, han convertido a este pequeño dominio en el modelo de estudio de múltiples trabajos, hasta el punto que se conoce la función estructural de casi cada uno de sus residuos.

A parte de controlar la tetramerización de p53 (y por tanto, su actividad), este dominio también lleva a cabo otras funciones. Su importancia dentro de la proteína también queda reflejada en el hecho que varios casos de cáncer se han asociado a mutaciones en la secuencia de p53TD que comprometen la habilidad de tetramerizar. De entre ellas, para la presente tesis se han seleccionado tres:

**R337H**, mutación germinal asociada al carcinoma adrenocortical. Es la mutación hereditaria más importante de p53. Su capacidad de tetramerización es extremadamente sensible al pH en el rango fisiológico, lo que se debe al estado de protonación de la histidina H337. En la estructura nativa la interacción entre R337 y D352 es fundamental para estabilizar el dímero primario. La mutación R337H puede, de algún modo, establecer esa interacción si la cadena lateral de la histidina está protonada (pH ácido), pero si no, el tetrámero se vuelve altamente inestable.

**G334V**, mutación encontrada en cánceres de pulmón. Pese a no ser muy frecuente, recientemente se ha descrito que, bajo condiciones fisiológicas, este dominio puede agregar rápidamente en estructuras tipo  $\beta$ -amiloide.

**L344P**, mutación asociada al síndrome hereditario Li-Fraumeni. La mutación irrumpe en el núcleo hidrofóbico de la proteína e impide el ensamblaje del tetrámero. La presencia de una prolina en la hélice  $\alpha$  también perturba la estructura secundaria y resulta en un dominio desestructurado.

De ahora en adelante, nos referiremos a las proteínas como p53wt (nativa), R337H, G334V y L344P, aunque en el presente estudio únicamente se ha trabajado con el dominio de tetramerización.

## 1.2. Obtención de las proteínas

En el grupo se disponía del clon para la producción recombinante de p53 nativa así como de un protocolo optimizado para la expresión y purificación.

Los mutantes R337H y G334V se obtuvieron por mutagénesis dirigida del clon nativo. Su expresión y purificación pudo realizarse satisfactoriamente por el protocolo ya existente.

Por el contrario, para la obtención del mutante L344P, una especie poco soluble y muy susceptible a la degradación de proteasas, fue necesario construir un nuevo clon. La nueva construcción contenía una cola de histinas que facilitaba su extracción del medio (por cromatografía de afinidad) aún y estar presente en muy poca cantidad. A continuación, la cola de histinas se eliminaba por digestión con la enzima TEV. Y finalmente, la proteína se purificaba de la reacción de digestión por cromatografía de afinidad inversa. La adición de un agente desnaturante como la urea a los extractos celulares ayudó a mejorar la solubilidad y evitar la degradación por proteasas.

Adicionalmente, el dominio de tetramerización de p53wt también se obtuvo por síntesis en fase sólida. La proteína recombinante presentaba unas colas no estructuradas en ambos extremos que la hacían inapropiada para experimentos de cristalización. La síntesis fue la manera más directa de “eliminar” dichas colas.

## 1.3. Caracterización biofísica de las proteínas

### 1.3.1. Dicroísmo circular

El estado de estructuración del dominio de tetramerización para las diferentes proteínas pudo caracterizarse fácilmente a través de sus espectros de dicroísmo circular (CD). R337H y G334V podían adoptar el mismo perfil de CD que p53wt, sin embargo su equilibrio de oligomerización estaba considerablemente menos desplazado (en particular, G334V). L344P, por el contrario, era un polipéptido de desestructurado.

Por CD también se realizaron estudios de estabilidad. Como era de esperar, las proteínas mutadas eran sensiblemente menos estables que la especie nativa. Sorprendentemente, aunque G334V mostraba un perfil menos estructurado a temperatura ambiente, era más estable que R337H.

Para R337H se reprodujeron con éxito los experimentos de estabilidad térmica en función del pH publicados por DiGiammarino *et al.* Por el contrario, para G334V no fue posible reproducir la  $\beta$ -agregación bajo las condiciones descrita por Higashimoto *et al.*, lo que podía deberse a la presencia de las colas no estructuradas en la proteína recombinante. Curiosamente, sí que se detectaron procesos de agregación en las curvas de temperatura de muestras más concentradas.

### 1.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

Por DSC se corroboraron los datos de estabilidad ya descritos por CD. Las proteínas mutantes no sólo presentaban una menor temperatura de fusión si no que también una menor entalpía de desplegamiento.

Para R337H, tal y como se había realizado por CD, se registraron curvas a diferentes pH. La disminución de estabilidad iba acompañada por una simetrización de la endoterma, lo que sugería que, en efecto, la especie tetramérica se perdía al aumentar el pH (*i.e.* al desprotonar H337).

El estudio por DSC de G334V fue imposible. A las concentraciones de trabajo de DSC, tal y como se había detectado por CD, la proteína experimentaba un proceso de agregación que impedía seguir la calor el experimento. Además, los agregados quedaban fuertemente adheridos a la celda y se requerían condiciones muy agresivas para eliminarlos.

### 1.3.3. Resonancia magnética nuclear

Los espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC para R337H y G334V mostraban un gran parecido con el de la proteína nativa, lo que sugería que debían adoptar estructuras tridimensionales (tetraméricas) semejantes. El espectro de p53wt ya se había asignado con anterioridad (tesis de X. Salvatella). Para R337H se realizaron los correspondientes experimentos de asignación, aunque para entonces apareció publicada su asignación por Galea *et al.*. La asignación de G334V no fue posible puesto que en las condiciones de trabajo del experimento la proteína agregaba (posiblemente en estructuras tipo  $\beta$ -amiloide).

### 1.3.4. Espectrometría de masas con ionización por electrospray

La detección directa del tetrámero no covalente fue posible por ESI-MS. En estos experimentos preliminares, las condiciones de ionización y detección posiblemente no eran óptimas como para apreciar los efectos de las mutaciones en la detección en fase gas.

### 1.3.5. Cristalografía de rayos X

Reproduciendo las condiciones descritas en la literatura, el dominio de tetramerización de p53 (sintético) pudo cristalizarse con facilidad. Lamentablemente, la difracción de uno de los cristales morfológicamente más pulcros reveló que se trataba de una macla y, aunque sí que era posible encontrar una celda unidad y una estructura de la proteína, este tipo de cristales no era el más apropiado para realizar experimentos de “*soaking*” con ligando, ya que sería dudoso determinar la incorporación del ligando en una estructura que no es perfecta.

## 2. Calix4bridge: un ligando diseñado para el dominio de tetramerización de p53

### 2.1. El diseño

Calix4bridge es un calix[4]areno diseñado racionalmente por el Prof. Javier de Mendoza (ICIQ) para interactuar con el dominio de tetramerización de p53. La parte inferior de la molécula (el *lower rim*) está constituido por un par de puentes hidrofóbicos que fijan la conformación cónica, y encajarían perfectamente en una pequeña cavidad hidrofóbica presente en la superficie de la proteína, constituida por las cuatro unidades monoméricas. En la parte superior (el *upper rim*) sobresalen cuatro grupos guanidinometil que podrían quelarse a residuos carboxilato presentes en la superficie de la proteína (E336 y E339) pertenecientes a diferentes monómeros. Debido a la simetría de p53TD, existen dos cavidades hidrofóbicas (equivalentes) de modo que la interacción con dos moléculas de calix4bridge podría mantener unidos los cuatro monómeros. Tal habilidad resultaría de gran utilidad en dominios mutados con tetramerización defectuosa (por ejemplo, R337H o G334V), pues la interacción con el calixareno podría estabilizar la estructura tetramérica.

Calix4bridge fue sintetizado y purificado por Vera Martos (del grupo de J. de Mendoza, ICIQ); el diagrama de síntesis se adjunta en el Apéndice I. El producto final utilizado para los estudios biofísicos fue la correspondiente sal de cloruro. Debido a la limitada solubilidad del compuesto en medios tamponados, los experimentos tuvieron que realizarse en agua, pese a no ser un medio ideal.

### 2.2. Efectos de calix4bridge en la estabilidad térmica de la proteína

La manera más directa de comprobar si calix4bridge podía interactuar con la proteína y fijar la estructura tetramérica pasaba por determinar la estabilidad térmica de las proteínas en presencia del ligando. Dicho estudio se realizó por curvas de temperatura en DSC y CD. Mientras que la estabilidad de la proteína nativa (de por sí ya muy estable) permanecía prácticamente inalterada en presencia de calix4bridge, para R337H se detectaba un aumento de prácticamente 20°C en su temperatura de fusión, acercando el perfil final al de la proteína nativa. Semejante aumento venía acompañado de un aumento en la entalpía de fusión y una asimetrización de la curva, tal y como correspondería al desplegamiento cooperativo de una proteína tetramérica (con mayor estructura). El desplazamiento tenía lugar de manera bifásica, lo que podía sugerir una elevada afinidad en la interacción de calix4bridge y R337H. Sin embargo, parte de esta afinidad también podría provenir por la protonación de H337, que podía aumentar su  $pK_a$  en el complejo con el ligando. Con respecto al mutante G334V, también se observó aumento en la estabilidad, pero mucho más modesto. La reproducción de resultados por ambas técnicas (que trabajan a concentraciones muy diferentes) fue una prueba a favor de la especificidad del proceso.

También resultó interesante comprobar que calix4bridge podía estabilizar G334V frente a la desnaturalización espontánea en el tiempo, lo cual resultaba muy interesante porque la interacción con calix4bridge podría ser capaz de evitar desordenes originados por el desplegamiento de la proteína (e.g. formación de  $\beta$ -amiloides).

## 2.3 Caracterización estructural del complejo por RMN

### 2.3.1. RMN sobre la proteína

Experimentos bidimensionales de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC sobre proteína isotópicamente marcada en presencia de calix4bridge permitieron localizar el lugar de unión del ligando, precisamente, en la cavidad hidrofóbica de la proteína en la que se había basado el diseño. Adicionalmente, el progreso de las resonancias de la proteína a lo largo de una valoración con ligando permitió realizar hipótesis sobre los mecanismos de interacción y las afinidades.

Para p53wt la unión de calix4bridge transcurría por un mecanismo tipo “llave-cerradura”, sin alterar la estructura de la proteína, y siendo los dos lugares de unión equivalentes e independientes. La afinidad se estimó con una constante termodinámica de disociación inferior a  $\sim 280\mu\text{M}$  (como correspondía a un régimen de intercambio rápido).

Para R337H, en cambio, la interacción transcurría en dos etapas, cada una de las cuales compatible con la unión de una molécula de ligando y algunos reajustes estructurales. Puesto que la segunda molécula parecía interactuar con mayor afinidad, el mecanismo de unión podía describirse como secuencial y cooperativo. Aunque no fue posible determinar valores para las constantes de disociación, la cinética de los procesos podría situar la primera por debajo de  $100\mu\text{M}$ , mientras que la segunda quedaría en torno al  $10\mu\text{M}$ . La mayor afinidad de calix4bridge hacia R337H sugería que la flexibilidad de la proteína jugaba un papel muy importante, pues podría moldear un lugar de unión mucho más óptimo, donde el ligando podría interactuar más fuertemente. No obstante, la mayor afinidad también podía deberse a que la mutación H337 se encuentra perfilando la cavidad hidrofóbica donde el ligando supuestamente interactúa.

La hipótesis de la plasticidad de la proteína, sin embargo, no era aplicable a los resultados de G334V. La interacción con este mutante también transcurría de manera secuencial, posiblemente con ligeras modificaciones en la estructura, pero la afinidad caía hasta valores semejantes (o superiores) a los de p53wt. La explicación en este caso residía en que la mutación V334 afecta probablemente a las dimensiones del lugar de unión, resultando en una cavidad más grande donde el ligando no podría establecer estrechas interacciones (ni hidrofóbicas ni electrostáticas).

El estudio de un análogo de calix4bridge en el que se habían sustituido los cuatro grupos guanidinio por grupos amino (llamado  $\text{NH}_2$ -calix4bridge), permitió evaluar el importantísimo papel de la quelación guanidinio-carboxilato en el anclaje del ligando en la proteína. De hecho, la afinidad de este amino-derivado era prácticamente cuatro veces menor que la de calix4bridge.

### 2.3.2. RMN sobre el ligando

Experimentos de  $^1\text{H}$ -STD sobre el ligando permitieron determinar el modo de unión de calix4bridge. La región inferior de la molécula (*lower rim*) se encontraba mucho más cercana a la proteína que la región superior de los guanidinos (*upper rim*), lo que era perfectamente compatible con el diseño, en el que la región inferior se insertaba en la cavidad hidrofóbica y la superior sobresalía en el exterior. Además, los resultados de STD, juntamente con los cambios detectados en las resonancias de  $^1\text{H}$  de calix4bridge en presencia de la proteína, sugerían una orientación preferida en la unión de la molécula, condicionada por los puentes hidrofóbicos.

### 2.4. Espectroscopía de masas con ionización por electrospray

La prueba concluyente de que el tetrámero de proteína interactuaba con dos moléculas de calix4bridge la proporcionó la detección de la masa del complejo por ESI-MS. Aunque se trataba de experimentos muy preliminares, los resultados sugerían la importancia de las interacciones hidrofóbicas, especialmente para el caso de R337H, lo cual estaba completamente acorde con el mecanismo propuesto por RMN.

### 2.5. Otros experimentos

#### 2.5.1. Calorimetría isotérmica de titulación

Se realizaron experimentos preliminares de ITC para poder caracterizar con mayor precisión la termodinámica de la interacción. Desafortunadamente, limitaciones experimentales derivadas de la no-idoneidad del agua no permitieron el análisis energético.

#### 2.5.2. Cristalografía

El afán por caracterizar completamente el sistema p53TD-calix4bridge, llevó a intentar la cristalización del complejo. Aunque se trata de un estudio incompleto, merece la pena mencionar los resultados preliminares obtenidos. Por una parte, la inmersión de cristales preformados de proteína en una solución de ligando, no afectaba en absoluto la morfología de los cristales, lo cual podría interpretarse como que el ligando interactuaba con la proteína respetando su red cristalina. Por otra parte, también se realizaron pruebas de cocrystalización y se obtuvieron cristales de (aparentemente) proteína, aunque todavía no se han podido difractar



### **3. Calix4prop: un ligando inesperado para el dominio de tetramerización de p53**

#### **3.1. Los orígenes**

Calix4prop se diseñó para evaluar el papel de la flexibilidad del ligando en la interacción con p53TD. La molécula presentaba también cuatro grupos guanidinometil en el borde superior, pero sus cuatro cadenas propilos en el borde inferior le proporcionaban una mayor libertad conformacional (aunque seguía siendo una estructura cónica). *A priori*, se pensó que la penalización entrópica que resultaría de ordenar los propilos en la cavidad hidrofóbica de la proteína sería demasiado elevada como para permitir la interacción. Sin embargo, los resultados experimentales mostraron un comportamiento muy distinto.

#### **3.2. Efectos de calix4bridge en la estabilidad térmica de la proteína**

En presencia de calix4prop, tanto p53wt como R337H experimentaban un considerable aumento en su estabilidad térmica. El desplazamiento en la temperatura de fusión, de 4°C para p53wt y ~30°C para R337H, venía acompañado por un aumento muy notable de la energía de desplegamiento, lo que sugería que la energía de unión del complejo debía ser considerable y, por tanto, la afinidad de calix4prop por las proteínas era elevada. El perfil asimétrico de DSC apuntaba a que se seguía tratando de una especie tetramérica (y de hecho, las curvas podían ajustarse al modelo matemático). La reproducción de los resultados por DSC y CD daba consistencia a la especificidad del proceso.

Para G334V, los efectos de calix4prop bien poco tenían que ver con la estabilización del complejo tetramérico. Al aumentar la temperatura, calix4prop promovía la transformación de G334V hacia una estructura (aparentemente) de lámina  $\beta$  que, posteriormente, se reorganizaba en agregados posiblemente de tipo amiloide. Porqué calix4prop causaba semejante comportamiento en este mutante es todavía una incógnita, pero posiblemente tenga que ver con la propia tendencia de la proteína a formar  $\beta$ -agregados.

#### **3.3 Caracterización estructural del complejo por RMN**

##### **3.3.1. RMN sobre la proteína**

La valoración de proteína con ligando seguida a través de HSQC, dio a conocer la gran afinidad que calix4prop mostraba por el dominio de tetramerización, así como los importantes cambios estructurales que experimentaba la proteína al interactuar con el ligando. La evolución de las resonancias de las proteínas sugería que la interacción transcurría de manera secuencial y cooperativa. Debido a la reorganización estructural que experimentaba la proteína, no fue posible determinar qué regiones interactuaban directamente con el ligando y tampoco calcular

afinidades, aunque tratándose de un régimen de intercambio lento, las constantes termodinámicas de disociación debía caer por debajo de 50 $\mu$ M.

La evaluación de un análogo de calix4prop donde los grupos guanidinio se habían sustituido por residuos amino (NH<sub>2</sub>-calix4prop), mostró cuan de importantes eran las interacciones electrostáticas para la formación del complejo. El hecho que disminuyera la afinidad por el primer lugar de unión permitió hacer un mejor seguimiento de los residuos más sensible a la presencia del ligando y, curiosamente, los más afectados pertenecían a la cavidad hidrofóbica y al núcleo hidrofóbico de la proteína. Esto hizo pensar en un posible mecanismo de interacción en el que los grupos propilo de calix4prop se “insertaban” en el corazón no polar de la proteína, lo que permitiría explicar la secuencialidad, la cooperación y los importantes cambios estructurales detectados. El papel de la interacción guanidinio-carboxilato también contribuiría a anclar la molécula en la proteína. Aunque se perturbaba el núcleo de la proteína, las nuevas interacciones hidrofóbicas que se establecían debían superar (y con creces) las que se eliminan, de modo que, globalmente, resultaba un complejo mucho más estable. Claro está que, una proteína más flexible (como R337H) permitía que este tipo de interacción se diera con mayor facilidad (es decir, más afinidad).

Para G334V, los cambios detectados en el espectro de la proteína también podían explicarse con este hipotético mecanismo, aunque la conformación más laxa de la proteína tal vez no podía generar un óptimo lugar de unión y la afinidad era menor que para p53wt y R337H. Estos cambios, lamentablemente, no permitían entender la  $\beta$ -transformación que experimentaba la proteína a temperaturas más elevadas.

### 3.3.2. RMN sobre el ligando

Debido a la gran afinidad con que calix4prop interaccionaba con los dominios de tetramerización, el estudio del modo de unión del ligando –que habría resultado de gran utilidad para entender el proceso– no se pudo determinar.

Los experimentos de <sup>1</sup>H-STD fracasaron porqué la dispersión de las resonancias del ligando no permitían irradiar selectivamente a la proteína.

Los resultados preliminares de experimentos de nOe transferido sugerían que, posiblemente, los grupos propilos quedaban fijados en una determinada conformación al interaccionar con la proteína, lo cual estaría acorde con el mecanismo planteado.

### 3.4. Espectroscopía de masas con ionización por electrospray

La prueba concluyente de que un tetrámero de proteína interaccionaba con dos moléculas de ligando fue la detección de la masa del complejo por ESI-MS. Es más, estos experimentos pusieron de manifiesto cuan importante era la componente hidrofóbica de la interacción aunque, para el caso de R337H, la interacción electrostática jugaba un papel mucho más importante que para las otras proteínas.

### **3.5. Otros experimentos**

#### **3.5.1. Entrecruzamiento químico**

El entrecruzamiento químico de la proteína (por gluteraldehído o por reacción directa de los carboxilatos y las aminas de la propia proteína) en presencia de calix4prop mostró de manera indirecta la relevancia de los cambios estructurales que tenían lugar en la proteína.

#### **3.5.2. Calorimetría isotérmica de titulación**

Experimentos preliminares de ITC también sugerían la existencia de dos procesos de elevada energía. Lamentablemente, la validez de los datos experimentales quedaba anulada por el uso de agua como medio de trabajo, y no se pudo caracterizar la termodinámica del sistema. Ciertamente, sin embargo, que el primer proceso parecía estar conducido por la componente entrópica, lo que estaba en sintonía con la existencia de cambios estructurales e interacciones hidrofóbicas.

#### **3.5.3. Cristalografía**

Para llegar a entender mejor qué le ocurría a la estructura de la proteína, se intentó cristalizar el complejo con calix4prop. Se trata de un estudio incompleto, pero merece la pena destacar la destrucción de cristales preformados de proteína cuando se sumergían en una solución de calix4prop, lo que ratificaba lo importante del cambio estructural. En pruebas preliminares de cocrystalización se detectaron micro-cristales, posiblemente de proteína, lo que resultaba muy prometedor.

## 4. Otras propiedades de reconocimiento molecular de los compuestos calix[4]arenos

Pese a que los calixarenos presentados en los capítulos anteriores mostraban especificidad por la interacción hacia p53, los resultados publicados por Ungaro y colaboradores sobre sus calixarenos *para*-guanidínicos capaces de interaccionar y transfectar plásmidos, nos motivaron a estudiar si nuestros compuestos también presentaban tal habilidad.

Reproduciendo los experimentos de EMSA (ensayo de desplazamiento de movilidad por electroforesis) descritos por esos autores, se pudo observar como, en efecto, nuestros calixarenos tetraguanidínicos también interaccionaban con el ADN plasmídico, aunque el comportamiento entre calix4prop y calix4bridge era sustancialmente diferente. La difusión de la banda electroforética originada por calix4bridge sugería una interacción de tipo electrostático, como correspondería al reconocimiento entre los grupos guanidinio del ligando y los fosfatos del plásmido. Por el contrario, calix4prop parecía compactar el plasmido en partículas que no podían penetrar en el gel y quedaban retenidas en el pocillo. Esta diferencia de comportamiento tenía su origen en la diferente funcionalización del *lower rim* de los calixarenos. Posiblemente el aumento de la concentración local de calix4prop al interaccionar con el plásmido favorecía la interacción entre las cadenas propilo, generando así estructuras muy compactas. La evaluación de los derivados amino (NH<sub>2</sub>-calix4bridge y NH<sub>2</sub>-calix4prop) puso de manifiesto el papel del *lower rim* así como de la interacción electrostática.

La capacidad de calix4prop de condensar ADN plasmídico nos llevó a probar su posible capacidad transfectora. Primero, se determinó la toxicidad por el ensayo de MTT y los resultados no fueron muy prometedores, pues calix4prop era altamente letal. Para llegar a detectar transfección se tuvo que aumentar la concentración de calix4prop hasta niveles tóxicos sobremanera. Así, aun y ser capaces de transfectar células con ADN plasmídico, las potenciales aplicaciones de esta molécula quedan totalmente lapidadas por su elevadísima toxicidad.

## Líneas de futuro.

Los resultados presentados a lo largo del trabajo han dado pie a nuevas preguntas, muchas de las cuales todavía restan por responder.

- > En referencia al estudio biofísico de las proteínas, falta entender el proceso de  $\beta$ -transformación y agregación de G334V recombinante. Se ha visto que bajo ciertas condiciones es posible detectar estos fenómenos, sin embargo la detección fue casual y sería necesario encontrar qué es lo que motiva la  $\beta$ -amiloidogénesis, así como la estructura final.
- > La detección por MS-ESI del tetrámero no covalente abre las puertas a un nuevo tema de estudio, con el objetivo de entender cómo las fuerzas en la fase gas pueden correlacionarse con las de la fase solución. El sistema p53TD y sus mutantes vuelve a ser un perfecto modelo de estudio.
- > En referencia a la interacción p53TD y calix4bridge, se han realizado suficientes experimentos como para entender y caracterizar con detalle el complejo. Sin embargo, sería realmente productivo llegar a conocer la conformación exacta del ligando en el complejo (experimentos de nOe transferido), así como llegar a cristalizar y resolver la estructura del propio complejo, no solo para p53wt sino también para sus mutantes. Lamentablemente, estos son objetivos a muy largo plazo. Más inmediato sería, por ejemplo, el estudio por ESI-MS para llegar a entender mejor el origen de las fuerzas que estabilizan el complejo.
- > Para la interacción de p53TD con calix4prop queda todavía mucho por hacer, siendo lo más primordial llegar a conocer qué le ocurre realmente a la estructura de la proteína: ¿son nuestras hipótesis correctas? La forma más directa de determinar la estructura del complejo sería cristalizándolo y difractándolo por rayos X. Sin embargo, esto puede llevar tiempo, y la estructura cristalina podría no representar al complejo en solución. Mientras tanto, llegar a conocer el modo de unión del ligando (e.g. por tr-nOe de NH<sub>2</sub>-calix4prop) también resultará clave para entender los mecanismos de interacción.

Otra alternativa para validar nuestras hipótesis y entender mejor los procesos que tienen lugar en la interacción proteína-ligando, consistiría en estudiar otros calixarenos, modificando sistemáticamente sus características estructurales (grupos funcionales, voluminosidad, etc.).

Por otra parte, todavía queda por entender cómo calix4prop motiva la  $\beta$ -amiloidogénesis de G334V.

- Después de haber probado que los calixarenos aquí descritos son capaces de estabilizar la forma tetramérica –y por tanto, la forma activa de la proteína– la idea más inmediata que se plantea es su ensayo biológico. Desafortunadamente, muchos son los inconvenientes que hacen prever el fracaso de dichos experimentos.

Lo primero, y más importante, es que los calixarenos no son soluble en medios altamente tamponados. Después, su afinidad tampoco es especialmente alta. Por esto y por su multivalencia, una multitud de interacciones no específicos podrían darse con otras biomoléculas (como nucleótidos, lípidos u otras proteínas) antes que con p53. Prueba de ello es la elevada toxicidad de calix4prop. Por último, en los experimentos aquí presentados únicamente se ha considerado el dominio de tetramerización; tal vez la interacción no pueda darse con éxito en presencia del resto de la proteína (aunque el dominio de tetramerización es estructuralmente independiente), o si se da, tal vez el ligando afecte negativamente a otras funciones del dominio.

- Finalmente, una vez probado el concepto de que un ligando sintético puede estabilizar la tetramerización de mutantes de p53TD, aproximaciones similares podrían llevarse a cabo utilizando ligando con mejores propiedades de ADME. Es más, la estrategia podría expandirse a otros sistemas en los que se busque la estabilidad de un complejo proteico.

# CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en los capítulos anteriores y considerando los objetivos inicialmente propuestos, se pueden extraer las siguientes conclusiones para la presente tesis doctoral:

## Objetivo 1

- i. Se han obtenido satisfactoriamente tres mutantes naturales del dominio de tetramerización de p53, con diferentes propiedades de oligomerización. Los mutantes son: G334V (encontrado a cánceres de pulmón), R337H (asociado a carcinoma adrenocortical) y L344P (asociado al síndrome hereditario Li-Fraumeni)

La obtención de los mutantes G334V y R337H se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida del clon original que codifica el p53TD nativo. La expresión en cultivos celulares y la purificación de estos mutantes se realizó siguiendo el protocolo ya optimizado para la proteína nativa. Por el contrario, para la producción recombinante del mutante L344P fue necesario construir un nuevo clon y desarrollar un nuevo protocolo para la purificación basado en His-tag.

Debe destacarse que la introducción del novedoso medio de auto-inducción para la expresión de proteína ha permitido mejorar notablemente los niveles de producción disminuyendo costes y esfuerzos.

- ii. Se ha puesto a punto un conjunto de experimentos biofísicos para la evaluación de las propiedades de tetramerización de las proteínas.

Experimentos dependientes de temperatura, como DSC ó CD, han determinado la estabilidad térmica de las proteínas. Las proteínas mutantes son considerablemente menos estables que la proteína nativa.

La dependencia de la estabilidad de R337H con respecto al pH también ha sido estudiada al detalle, reproduciendo satisfactoriamente los resultados publicados por DiGiammarino y colaboradores. Por el contrario, reproduciendo las condiciones descritas por Higashimoto *et al.* no se ha observado agregación amiloide de G334V. No obstante, sí que se detectó dicho proceso trabajando a concentraciones más elevadas.

Por dicroísmo circular se ha obtenido información sobre el estado de oligomerización de las proteínas. A elevadas concentraciones, los mutantes G334V y R337H también pueden adoptar el mismo perfil de CD que la proteína nativa. Esto, juntamente con los espectros de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC y los resultados de entrecruzamiento químico, sugiere un nivel estructural similar para estas proteínas (es decir, pueden formar un tetrámero similar). Por el contrario, y como era de esperar, el mutante L344P no es más que un péptido desestructurado

Curiosamente, aunque G334V es térmicamente más estable que R337H, su equilibrio de tetramerización se encuentra menos desplazado. Por tanto, no siempre es correcto correlacionar nivel estructural a temperatura ambiente con estabilidad térmica.

Finalmente, experimentos preliminares por ESI-MS han detectado directamente la existencia del tetrámero no covalente, algo sin precedentes en la literatura.

## Objetivo 2

Se ha probado con éxito el concepto de que un ligando sintético es capaz de estabilizar el estado oligomérico de proteínas defectuosas.

El caso de los calix[4]arenes y p53TD también ha proporcionado entendimiento sobre otros fenómenos que tienen lugar en los procesos de reconocimiento molecular proteína-ligando.

### i. Calix4bridge

Los resultados biofísicos permiten concluir con toda certeza que calix4bridge interacciona selectivamente con el dominio de tetramerización de p53 así como con sus mutantes, y dicha interacción estabiliza la estructura tetramérica de las proteínas mutantes.

Desde un punto de vista estructural, el modelo de interacción de calix4bridge ha sido totalmente validado por experimentos de RMN en la proteína y en ligando. Los resultados por ESI-MS han proporcionado la prueba concluyente de la estequiometría 1:2 tetrámero-ligando.

El mecanismo de interacción también se ha podido elucidar en base a los resultados de RMN y pone de manifiesto el importante papel que juega la flexibilidad estructural de la proteína en el proceso de interacción. La interacción entre la proteína nativa (compacta y estable) y calix4bridge se puede describir como un proceso tipo "llave-cerradura", con los dos lugares de unión equivalentes e independientes ( $K_D \sim 280 \mu\text{M}$ ). Por el contrario, para R337H la unión de las dos moléculas de ligando tiene lugar secuencial y cooperativamente, con mucha mayor afinidad que p53wt ( $K_D < 50 \mu\text{M}$ ) y promoviendo cambios estructurales. Para G334V, sin embargo, aun y ser también una estructura más flexible que p53wt, la afinidad no difiere de la observada para la proteína nativa, lo que probablemente se deba a que la mutación afecta a las dimensiones del lugar de unión y el ligando no puede encajar de manera óptima.

La baja afinidad de un ligando control en el que se sustituyeron los grupos guanidinio por amino, pone de manifiesto el papel crucial de la quelación guanidinio-carboxilato en la interacción. En números, la afinidad por la proteína nativa se ve reducida prácticamente en un factor de cuatro ( $K_D \sim 1\text{mM}$ ).

En conclusión, las evidencias experimentales indican que calix4bridge estabiliza la estructura tetramérica, pero sólo de aquellos dominios que pueden estructurarse. El ligando no puede recuperar el tetrámero de mutantes en los que se han perdido hasta los elementos de estructura secundaria.



## ii. Calix4prop

La introducción de flexibilidad en la molécula de calixarenos (*i.e.* calix4prop) ha resultado en un ligando con gran afinidad por los dominios de tetramerización de p53wt y R337H, capaz de inducir un gran aumento en su estabilidad térmica. No obstante, la unión del ligando también induce cambios importantes en la estructura de las proteínas.

Curiosamente, la presencia de calix4prop hace que el mutante G334V sea más propenso a formar  $\beta$ -agregados. Todavía no se ha encontrado una explicación a este fenómeno.

Los resultados biofísicos por varias técnicas sugieren que la unión específica, secuencial y cooperativa de dos moléculas de calix4prop a la proteína, podría perturbar del núcleo hidrofóbico de la misma; una posible hipótesis sería que las cadenas propilo (no polares) se insertan en el corazón de la proteína.

La constante termodinámica de disociación para el complejo p53TD-calix4prop se estima en el rango bajo del micromolar. La flexibilidad de la proteína es esencial para una interacción fuerte. A su vez, la evaluación de derivados de calix[4]propyl con diferentes grupos funcionales en el borde superior, pone de manifiesto la relevancia de una óptima quelación guanidinio-carboxilato en el proceso de reconocimiento molecular.

En conclusión, la flexibilidad de los componentes (*i.e.* proteína y ligando), lejos de penalizar, parece favorecer la interacción. Las penalizaciones entrópicas y entálpicas por la pérdida de grados de libertad y cambios estructurales en la proteína, pueden ser compensadas por fuertes interacciones hidrofóbicas y electrostáticas entre la proteína y el ligando. El balance energético final no es fácil de prever y puede dar lugar a comportamientos inesperados.

## Además...

En base a los resultados publicados por Ungaro y colaboradores, otras propiedades de reconocimiento molecular de los calix[4]arenos han sido también estudiadas.

Calix4bridge y calix4prop son capaces de interactuar con el ADN, probablemente a través del reconocimiento de los grupos guanidinio con los fosfatos de los ácidos nucleicos. Calix4prop no solo se une a ADN plasmídico, si no que además es capaz de condensarlo en partículas que pueden ser transfectadas al interior de las células (probablemente vía endocitosis). Lamentablemente, la elevada toxicidad de calix4prop limita sus potenciales aplicaciones en ensayos *in vivo*.

