

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

En l'evolució dels organismes, les proteïnes han esdevingut fonamentals per a la realització de pràcticament tots els processos cel·lulars. Així, el funcionament cel·lular ha evolucionat fins a un complex entramat de mecanismes relacionats entre sí i duts a terme principalment per les proteïnes. En la majoria d'aquests mecanismes, les proteïnes involucrades han d'interaccionar amb altres proteïnes, de manera que tots aquests contactes proteïna-proteïna resulten vitals per al correcte funcionament de la cèl·lula. En aquest sentit, és clar que la modulació d'aquests contactes ofereix un ampli ventall de possibilitats des d'un punt de vista terapèutic.

Aquest fet, conjuntament amb els avenços realitzats en els últims anys en el camp de la genòmica i la proteòmica, els quals dia a dia fan que es disposi de l'estructura de més proteïnes, ha augmentat molt l'interès en poder entendre com les proteïnes interaccionen entre sí i com han de ser els lligands capaços de modular aquests contactes.

0.1 INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA

Des de l'anàlisi dels primers complexos proteïna-proteïna determinats mitjançant espectroscòpia de raigs X, s'ha intentat racionalitzar quins són els trets que hi ha en comú en les interfases dels complexos proteics¹.

A principis dels anys 90, a partir de l'estructura de 15 complexos proteasa-inhibidor i 4 complexos anticòs-antigen es van començar a establir el tipus d'àtoms involucrats en aquests contactes². En aquests estudis es va determinar que les proteïnes interaccionaven entre sí a través de grans àrees de la seva superfície. En general, es va poder veure que aquestes àrees de contacte eren força planes i en total ocupaven uns 1600\AA^2 (800\AA^2 per cada proteïna). A més a més, es va concloure que aparentment els àtoms involucrats no eren clarament diferents als de la resta de la superfície, essent en general un 55% de caràcter apolar, un 25% de caràcter polar i el 20% restant de caràcter polar amb càrrega.

Uns anys més tard, els mateixos autors van ampliar l'estudi a 75 complexos proteïna-proteïna de diferents tipus, arribant a conclusions globals força similars³. En aquests estudis, van confirmar l'àrea de les superfícies involucrades i van observar, que en general, els contactes proteïna-proteïna produïen pocs canvis conformacionals. Com a excepció a aquesta tendència, van determinar que els contactes produïts a través d'àrees sensiblement més petites corresponien a complexos amb temps de vida mig molt curts, i que els contactes produïts a través d'àrees clarament més grans normalment comportaven grans canvis conformacionals. Així, aquests autors, en general comparaven la interacció entre dues proteïnes a la interacció entre dos cossos pràcticament rígids.

A més a més, en aquests estudis suggereixen que els àtoms involucrats en els contactes proteïna-proteïna es poden classificar en tres tipus diferents en funció del grau d'accessibilitat al solvent que perden en la complexació (figura 0.1). En aquesta classificació, tots els àtoms que perden un cert grau d'accessibilitat al solvent (A, B i C) s'anomenen àtoms d'interfase, els àtoms amb un major grau de pèrdua d'accessibilitat (B i C) s'anomenen de contacte, i d'entre ells, els àtoms que perden totalment l'accessibilitat (B) s'anomenen àtoms enterrats.

¹ Chothia, C. & Janin, J., *Nature*, (1975), **256**, 705-708

² Janin, J. & Chothia, C., *J. Biol. Chem.*, (1990), **265**, 16027-16030

³ Lo Conte, L., Chothia, C., & Janin, J., *J. Mol. Biol.*, (1999), **285**, 2177-2198

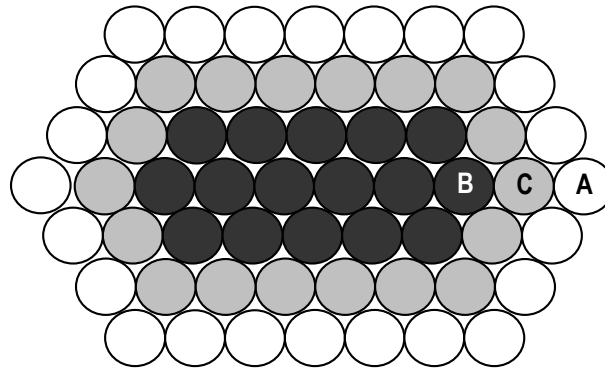


Figura 0.1 Esquema de la classificació dels tipus d'àtoms de la superfície d'una proteïna involucrada en contactes proteïna-proteïna³.

Per últim, en una anàlisi del tipus de residus que formen part de les interfases dels complexos analitzats, mostren com aquestes interfases són força riques en residus com l'arginina i la tirosina (taula 0.1).

Residu	% en interfase	% en superfície accessible al solvent
Ala	2,6	4,0
Arg	10,1	8,9
Asn	5,5	6,2
Asp	5,2	7,1
Cys	1,5	0,7
Gln	4,2	6,0
Glu	6,1	9,8
Gly	4,6	4,5
His	3,6	1,9
Ile	4,2	2,4
Leu	5,5	4,1
Lys	6,7	11,8
Met	3,2	1,2
Phe	4,4	2,0
Pro	4,4	5,1
Ser	5,5	8,4
Thr	5,1	7,3
Trp	4,5	1,3
Tyr	9,1	3,2
Val	3,8	3,5

Taula 0.1 Composició de les interfases dels complexos proteïna-proteïna i de la resta de superfície que queda accessible al solvent.

És especialment interessant la comparació de la composició de les interfases dels complexos amb la composició de la resta de superfície que queda accessible al solvent. En aquesta comparació, es pot veure com respecte la resta de la superfície, en les interfases hi ha un clar enriquiment dels residus aromàtics i un clar empobriment de residus com la lisina i l'àcid glutàmic.

A diferència d'altres autors que han suggerit que la interacció entre proteïnes es dona gràcies a la formació de clústers hidrofòbics⁴, en aquests estudis apunten que tan la part polar com la part apolar són essencials en la interacció.

Altres autors, també han analitzat les àrees involucrades en els contactes entre proteïnes per tal de veure quins són els trets que tenen en comú, i així poder predir, a partir de l'estructura de la proteïna, per on interacciona amb d'altres proteïnes i quina és la seva funció⁵. Aquests, conclouen que en general els contactes proteïna-proteïna es donen a través de superfícies força planes les quals són força accessibles al solvent. Pel que fa al caràcter dels residus involucrats, conclouen que globalment són similars als de la resta de la superfície, i també observen un cert enriquiment en el percentatge d'arginines i de residus aromàtics.

Tot i això, apunten que les generalitzacions són difícils de fer perquè en funció del tipus de complex analitzat les interfases són força diferents. Així, en l'anàlisi de multimers constitutius (aquells que estan sempre complexats) veuen que la majoria de residus són hidrofòbics, però en el cas dels complexos no constitutius (aquells que existeixen com a complexos i com a estructures independents) les superfícies involucrades poden ser de les més hidrofíliques de la proteïna. Això és especialment notori en el cas de les interfases entre anticossos i els corresponents antigens, les quals, coincidint amb observacions publicades anteriorment⁶, són de marcat caràcter polar.

En aquest mateix sentit, matisen que la forma de les superfícies involucrades també depèn molt de les proteïnes en contacte, ja que per exemple, en el cas de la interacció entre una proteïna gran i una de bastant més petita, normalment la petita s'introdueix en alguna cavitat de la gran, essent l'exemple més notori el cas dels inhibidors enzimàtics⁷.

Una altra estratègia que s'ha utilitzat per elucidar quins són els residus involucrats en els complexos proteics, és la mutació per alanina de cadascun dels residus de la interfase i posterior anàlisi de l'estabilitat del complex corresponent⁸. En aquesta aproximació, s'anomenen punts calents o "Hot spots" els residus que en mutar-se produeixen una major desestabilització del complex.

⁴ Young, L., Jernigan, R.L. & Covell, D.G., *Protein Sci.*, (1994), **3**, 717-729

⁵ Jones, S & Thornton, J.M., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, (1996), **93**, 13-20

Jones, S & Thornton, J.M., *J. Mol. Biol.*, (1997), **272**, 121-132

⁶ Hopp, T.P. & Woods, K.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1981), **78**, 3824-3828

⁷ Laskowski, R.A., Luscombe, N.M., Swindells, M.B. & Thornton, J.M., *Protein Sci.*, (1996), **5**, 2438-2452

⁸ Clackson, T. & Wells, J.A., *Science*, (1995), **267**, 383-386

A partir de l'anàlisi de les bases de dades de mutants de diferents complexos heterodimèrics, altres autors han analitzat quin són els residus clau ("Hot spot") per a la formació del complex corresponent (taula 0.2)⁹. La principal conclusió que en treuen, és que els aminoàcids que més freqüentment són vitals per a la formació dels complexos proteics analitzats són el triptòfan, l'arginina i la tirosina.

Residu	% "Hot spot"
Arg	13,30
Asn	5,05
Asp	9,04
Cys	0
Gln	3,13
Glu	3,64
Gly	3,57
His	8,00
Ile	9,62
Leu	0,83
Lys	6,29
Met	2,90
Phe	3,01
Pro	6,74
Ser	1,12
Thr	1,53
Trp	21,05
Tyr	12,30
Val	0

Taula 0.2 Residus clau en els contactes proteïna-proteïna. El % "Hot spot", fa referència al percentatge de vegades que el residu actua com a residu clau respecte el número de mutacions d'aquest residu presents en les bases de dades⁹.

Aquests autors, suggereixen que en la interfase dels contactes proteïna-proteïna en la part central hi ha una sèrie de residus clau, els quals estan envoltats per un conjunt de residus, de caràcter força hidrofòbic, que contribueixen moderadament a l'estabilitat del complex. La funció principal d'aquest anell de residus ("O-ring") és l'exclusió del solvent per tal de formar un entorn amb una constant dielèctrica efectiva que afavoreixi les interaccions entre els residus clau del complex (figura 0.2). La presència d'aquest anell hidrofòbic, aïlla els residus clau de la competència amb l'aigua fet que contribueix a disminuir la dissociació del complex.

⁹ Bogan, A.A. & Thorn, K.S., *J. Mol. Biol.*, (1998), **280**, 1-9

A més a més, amb aquesta idea s'explica perquè en les anàlisis presentades anteriorment es trobava que en les interfases dels complexos hi havia aproximadament un 50% de residus hidrofòbics però en l'anàlisi dels residus clau es troba que aquests no acostumen a ser-ho.

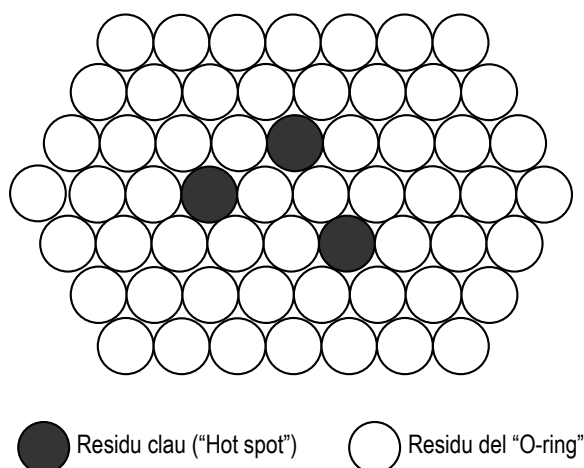


Figura 0.2 Representació esquemàtica dels residus d'una superfície proteica involucrada en contactes proteïna-proteïna segons al teoria dels "Hot spots" i del "O-ring"⁹.

A partir d'aquests estudis, doncs, s'obté una idea del percentatge de vegades que un determinat residu actua com a residu clau quan aquest es troba en la interfase d'un complex proteïna-proteïna. Multiplicant aquest percentatge per la composició de les interfases dels complexos proteïna-proteïna de la taula 0.1, es pot obtenir un valor representatiu del percentatge de "Hot spots" que hi ha en les interfases per a cada tipus de residu (figura 0.3).

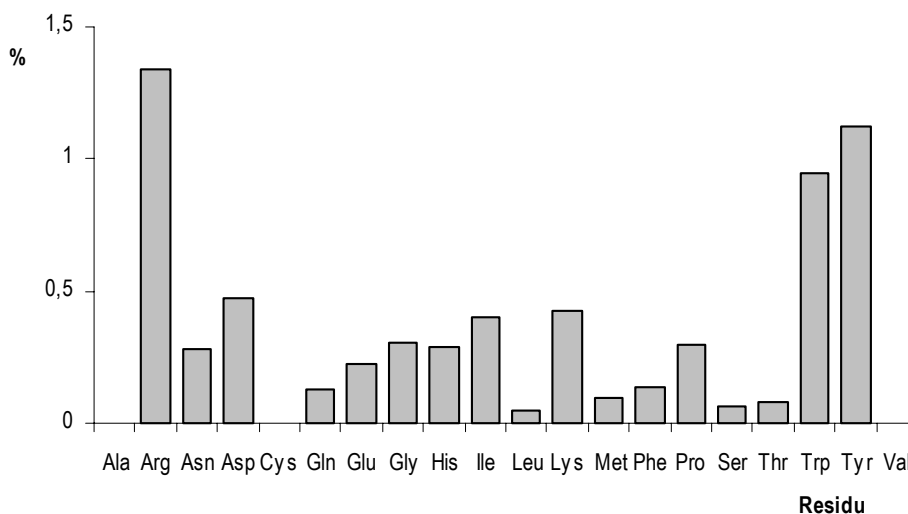


Figura 0.3 % de "Hot spot" de cada tipus de residu en les interfases (valor obtingut de la multiplicació del % en interfase pel % "Hot spot" per a cadascun dels residus).

Així, tenint en compte que aquests valors, es pot concloure que en general el residu que actua més freqüentment com a residu clau en els contactes proteïna-proteïna és l'arginina, seguida de la tirosina i el triptòfan. Ja amb molta menys proporció, també s'hi troben residus com l'àcid aspàrtic, la lisina i la isoleucina.

En general, sembla que els residus que tenen més tendència a actuar com residu clau, són aquells capaços de formar un gran nombre d'interaccions diferents. En aquest sentit l'arginina, la tirosina i el triptòfan són uns candidats excel·lents, ja que poden intervenir en interaccions de diferent caràcter. En el cas del triptòfan i la tirosina, poden contribuir a interaccions de caràcter aromàtic, interaccions de caràcter hidrofòbic, a enllaços d'hidrogen i a interaccions π -catió. Per contra, l'arginina pot intervenir principalment en interaccions de caràcter electrostàtic, d'enllaç d'hidrogen i π -catió, tot i que gràcies als tres metilens i a la deslocalització dels electrons en el grup guanidini, també pot intervenir en interaccions amb un cert caràcter hidrofòbic o pseudo-aromàtic.

A més a més, si es compara la contribució dels residus carregats positivament i la dels carregats negativament, es pot veure com els que tenen càrrega positiva són molt més freqüents com a residus clau. Aquest fet, conjuntament amb l'elevada contribució dels residus aromàtics podria ser indicatiu que la interacció π -catió és un interacció fonamental en els contactes proteïna-proteïna. De fet, aquest tipus d'interacció, en estudis amb pèptids model s'ha vist que pot ser molt important¹⁰.

La presència d'una sèrie de residus clau en les interfases dels complexos proteics, és una teoria àmpliament acceptada avui en dia. De fet, altres autors han buscat mètodes alternatius per tal de determinar quins són aquests residus, com per exemple mitjançant l'anàlisi de quins són els residus més conservats en les superfícies de proteïnes de la mateixa família¹¹. Mitjançant aquesta metodologia han arribat a conclusions similars pel que fa als residus clau en els contactes entre proteïnes, però suggereixen que aquests no es troben només en la part central de la interfase sinó distribuïts per tota l'àrea de contacte per tal de mantenir un cert grau de flexibilitat.

A més a més, estudis recents, també revelen que en els contactes proteïna-proteïna també es formen enllaços d'hidrogen amb l'esquelet que poden ser claus per a l'estabilitat del complex¹². Tampoc no s'ha d'oblidar el paper clau que poden tenir molècules discretes d'aigua en les interaccions entre grups polars, ja que poden arribar a permetre la interacció de per exemple, grups amb la mateixa càrrega¹³.

¹⁰ Pletneva, E.V., Laederach, A.T., Fulton, D.B. & Kostić, N.M., *J. Am. Chem. Soc.*, (2001), **123**, 6232-6245

¹¹ Hu, Z., Ma, B., Wolfson, W. & Nussinov, R., *Proteins*, (2000), **39**, 331-342

Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H. & Nussinov, R., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, (2003), **100**, 5772-5777

¹² Fernández, A. & Scheraga, H.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2003), **100**, 113-118

¹³ Papoian, G.A., Ulander, J. & Wolynes, P.G., *J. Am. Chem. Soc.*, (2003), **125**, 9170-9178

0.2 MODULACIÓ DE CONTACTES PROTEÏNA-PROTEÏNA

En el desenvolupament de nous fàrmacs, la majoria de dissenys es basen en la utilització de molècules petites amb un elevat component hidrofòbic i una baixa llibertat conformacional, que reconeixen les cavitats que hi ha en les superfícies proteïques, essent l'augment d'entropia degut al desplaçament de l'aigua de la cavitat, la principal contribució energètica que governa aquestes interaccions¹⁴. Mitjançant aquesta estratègia s'han aconseguit desenvolupar molts fàrmacs i avui en dia es disposen d'abundants eines per dissenyar-ne de nous. Tot i això, en el disseny d'aquest tipus de fàrmacs cada dia és més clar que s'han de considerar les proteïnes com a entitats flexibles i no com a l'aparent estructura rígida que s'obté, per exemple, de la determinació estructural per raigs X¹⁵.

En el cas del reconeixement de superfícies, resulta encara més evident que cal tenir en compte aquesta flexibilitat, ja que les cadenes laterals dels residus de la superfície no estan fixades, sinó que presenten una elevada mobilitat i plasticitat. A més a més, en aquest tipus de reconeixement, a diferència dels lligands dirigits a les cavitats, hi ha el problema que s'ha de competir amb la solvatació de l'aigua. És per això que avui en dia encara no es disposa de gaires exemples de lligands capaços de reconèixer les superfícies, i per tant, encara no s'han establert uns criteris generalitzables per al seu disseny. Així doncs, la possibilitat d'establir aquests criteris és un dels objectius de molts grups de recerca.

En el disseny dels lligands capaços de modular els contactes proteïna-proteïna, s'hi troben dos objectius diferents¹⁶. D'una banda, hi ha els lligands capaços d'estabilitzar l'estructura de la proteïna, induir-ne la dimerització o activar-ne la resposta biològica. De l'altra, s'hi troben tots els lligands dirigits a bloquejar els contactes entre diferents proteïnes. En tots aquests lligands s'hi poden descriure tres nivells de complexitat creixent¹⁷.

- 1- Reconeixement individual dels diferents grups funcionals dels aminoàcids.
- 2- Reconeixement simultani dels diferents residus clau distribuïts en la superfície de la proteïna.
- 3- Reconeixement també dels residus que envolten als residus clau.

Tot i la complexitat que suposa el descobriment d'aquest tipus de lligands, en la bibliografia es poden trobar exitosos exemples basats en diferents estratègies, descrites a continuació.

¹⁴ Davis, A. & Teague, S.J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (1999), **38**, 736-749

¹⁵ Teague, S.J., *Nat. Rev. Drug Discov.*, (2003), **2**, 527-541

¹⁶ Pecuh, M.W. & Hamilton, A.D., *Chem. Rev.*, (2000), **100**, 2479-2494

¹⁷ Pecuh, M., Orner, B. & Hamilton, A., *Chem. Brit.*, (2000), 43-45

0.2.1 GENÈTICA QUÍMICA

Segons aquest concepte, l'objectiu és aconseguir identificar una molècula petita per a cadascun dels productes dels gens¹⁸, és a dir, per a cada proteïna trobar una molècula petita capaç de reconèixer-la selectivament.

El reconeixement de les superfícies proteïques amb lligands petits presenta una sèrie de problemes aparentment difícils de solventar, però que en alguns casos s'han pogut superar¹⁹. La primera dificultat sorgeix quan es volen identificar molècules petites per a superfícies de les quals no se'n coneix cap lligand no proteic natural, problema que en certs casos s'ha pogut resoldre mitjançant la utilització de petits fragments peptídics basats en fragments de les altres proteïnes que hi interaccionen.

Una altra dificultat important que presenten els lligands petits, és que han de ser capaços de modular contactes que es produeixen a través de àrees molt grans. Per tal d'aconseguir-ho, la majoria d'aquests lligands es basen en el reconeixement dels residus clau en la interacció entre les diferents proteïnes.

Per últim, hi ha el problema que les superfícies de contacte entre proteïnes són força planes i això en dificulta el reconeixement mitjançant lligands petits. Per solventar aquest problema, una possibilitat és la cerca de lligands dirigits a les irregularitats presents en aquestes superfícies, ja que així es pot maximitzar en nombre d'interaccions en el mínim volum²⁰. Una altra alternativa és buscar lligands que reconeguin altres zones de la proteïna, però que en modulin els seus contactes amb d'altres proteïnes mitjançant mecanismes al·lostèrics.

Per solucionar totes aquestes dificultats hi ha tingut un paper clau la química combinatòria, mitjançant la qual s'han preparat diferents quimiotèques que han permès identificar lligands petits capaços de modular contactes proteïna-proteïna²¹. Entre els diferents exemples descrits en la bibliografia s'hi poden trobar els següents:

Inhibidors de la interacció entre Bcl-x_L o Bcl-2 i el domini Bak-BH3

En alguns casos de càncer, s'ha trobat una elevada resistència als fàrmacs basats en la potenciació de l'apoptosi o mort cel·lular programada. En aquests casos, s'ha trobat que és força freqüent la sobreexpressió de les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-x_L i Bcl-2 les quals inhibeixen la funció de la proteïna pro-apoptòtica Bak unint-se al seu domini BH3. Mitjançant l'anàlisi d'una quimioteca disponible

¹⁸ Schreiber, S.L., *Bioorg. Med. Chem.*, (1998), **6**, 1127-1152

¹⁹ Berg, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2003), **42**, 2462-2481

²⁰ Pettit, F.K. & Bowie, J.U., *J. Mol. Biol.*, (1999), **285**, 1377-1382

²¹ Boger, D.L., *Bioorg. Med. Chem.*, (2003), **11**, 1607-1613

comercialment, s'ha pogut trobar molècules que inhibeixen aquesta interacció ($K_i = 2,4-4,1\mu\text{M}$) (figura 0.4)²².

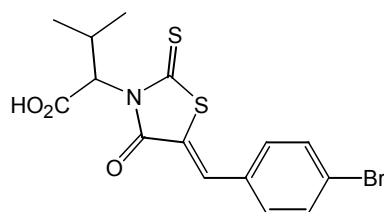


Figura 0.4 Exemple d'un dels inhibidors trobats (BH3I-1).

Activació del receptor EPO (EPOr)

La producció de glòbuls vermells està controlada per l'hormona erythropoietina (EPO), la qual n'activa la producció mitjançant la unió a dos receptors EPO, fet que en provoca la dimerització. En aquest cas, s'han trobat molècules que n'indueixen la dimerització mitjançant dues aproximacions.

D'una banda s'han aconseguit lligands força efectius mitjançant la preparació de dendrimers basats en la presentació de diferents còpies de mimètics de l'EPO trobats a partir de l'anàlisi de diferents quimioteques²³. De l'altra, també s'han aconseguit bons agonistes mitjançant la preparació de quimioteques de productes amb simetria C_2 (figura 0.5)²⁴.

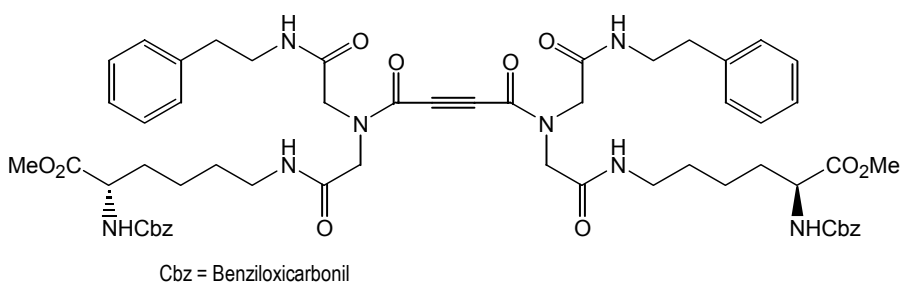


Figura 0.5 Exemple d'un dels agonistes de simetria C_2 de l'hormona EPO (A7B10C1).

²² Degterev, A., Lugovskoy, A., Cardone, M., Mulley, B., Wagner, G., Mitchison, T. & Yuan, J., *Nat. Cell. Biol.*, (2001), **3**, 173-182

²³ Qureshi, S.A., Kim, R.M., Konteatis, Z., Biazzo, D.E., Motamedi, H., Rodrigues, R., Boice, J.A., Calaycay, J.R., Bednarek, M.A., Griffin, P., Gao, Y.-D., Chapman, K. & Mark, D.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1999), **96**, 12156-12161

²⁴ Goldberg, J., Jin, Q., Ambrose, Y., Satoh, S., Deshamais, J., Capps, K. & Boger, D.L., *J. Am. Chem. Soc.*, (2002), **124**, 544-555

Inhibició de l'agregació de la Transthyretin (TTR)

La TTR és una proteïna tetramèrica la qual transporta tiroxina i la proteïna d'unió a retinol. La desestabilització d'aquesta proteïna, agregació en fibrilles amiloides i posterior dipòsit en els nervis perifèrics i teixits del cor, s'ha vist que està relacionada amb diferents patologies que poden arribar a ser mortals. La formació d'aquestes fibrilles prèviament requereix una dissociació del tetràmer en monòmers amb una estructura terciària alterada²⁵.

Mitjançant l'exploració de fàrmacs ja existents s'han trobat diferents molècules que s'uneixen al lloc d'unió de la tiroxina, fet que provoca una estabilització de l'estructura tetramèrica i per tant, una inhibició de la formació d'agregats (figura 0.6)²⁶.

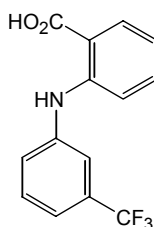


Figura 0.6 Estructura de l'àcid flufenàmic (FLU), antiinflamatori no esteroideic capaç d'inhibir l'agregació de la TTR.

Un dels problemes que presenta l'avaluació de grans quimiotèques de productes en front de diferents proteïnes és l'elevat cost que comporta. Per aquesta raó, en els darrers anys també s'han dedicat molts esforços a millorar les eines computacionals per a l'avaluació de la possible interacció entre diferents lligands i superfícies proteiques²⁷. Tot i que encara queden força punts per resoldre, aquestes tècniques ja s'han aplicat amb èxit per trobar molècules actives, com per exemple inhibidors de la interacció Bcl-2/Bak²⁸.

0.2.2 “PHAGE DISPLAY”

Una altra alternativa a la síntesi de quimiotèques és la utilització de la presentació de múltiples fragments peptídics en la superfície de partícules virals²⁹. Mitjançant aquesta aproximació, s'han pogut

²⁵ Lai, Z., Colón, W. & Kelly, J.W., *Biochemistry*, (1996), **35**, 6470-6482

²⁶ Klabunde, T., Petrassi, H.M., Oza, V.B., Raman, P., Kelly, J.W. & Sacchettini, J.C., *Nat. Struct. Biol.*, (2000), **122**, 2178-2192

²⁷ Zeng, J., *Comb. Chem. High T. Scr.*, (2000), **3**, 355-362

²⁸ Wang, J.-L., Liu, D., Zhang, Z.-J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S.M., Croce, C.M., Alnemri, E.S. & Huang, Z., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2000), **97**, 7124-7129

²⁹ Smith, G.P. & Petrenko, V.A., *Chem. Rev.*, (1997), **97**, 391-410

identificar pèptids capaços de reconèixer diverses proteïnes, com per exemple, pèptids capaços de mimetitzar l'hormona EPO³⁰.

Un dels principals problemes dels pèptids, és que en general tenen una baixa estabilitat que en limita molt la seva utilització com a fàrmacs. Una estratègia molt ocurrent per tal de trobar pèptids amb aminoàcids D, i per tant resistents a les proteases, és la utilització del que anomenen "mirror phage display". En aquesta estratègia s'avalua la interacció dels fragments peptídics amb una proteïna sintetitzada totalment amb aminoàcids D, de manera que els pèptids identificats, si se sintetitzen totalment amb aminoàcids D, s'uniran a la proteïna nativa³¹.

0.2.3 ANTICOSSOS MONOCLONALS

En el propi funcionament dels organismes, el reconeixement de tot tipus de superfícies proteiques està resolt a un nivell d'extraordinària precisió mitjançant la generació d'anticossos, els quals interaccionen amb grans àrees de la superfície de les proteïnes. Considerant que avui en dia es coneix la metodologia necessària per obtenir anticossos monoclonals, la seva utilització per al reconeixement de superfícies proteiques es presenta força prometedora³².

De fet, ja fa temps que els anticossos s'utilitzen com a diagnòstic per a la detecció de determinades proteïnes, però més recentment també s'ha plantejat la possibilitat d'utilitzar-los en la teràpia contra el càncer³³. Un exemple clar és la utilització d'anticossos per inhibir la dimerització Her2/neu en la teràpia contra el càncer de mama³⁴.

0.2.4 PÈPTIDS DE LA INTERFASE

Una de les estratègies més productives per tal de trobar pèptids dirigits a inhibir contactes proteïna-proteïna és la utilització de pèptids de la interfase. La idea, és que si dues proteïnes interaccionen entre sí, aquesta interacció es pot inhibir mitjançant la utilització de pèptids més petits basats en la seqüència dels residus involucrats en la interacció. A més a més, a partir d'aquest pèptids es poden dissenyar

³⁰ Wrighton, N.C., Farrell, F.X., Chang, R., Kashyap, A.K., Barbone, F.P., Mulcahy, L.S., Johnson, D.L., Barrett, R.W., Joliffe, L.K. & Dower, W.J., *Science*, (1996), **273**, 458-463

³¹ Schumacher, T.N.M., Mayr, L.M.Jr., Milhollen, M.A., Burgess, M.W. & Kim, P.S., *Science*, (1996), **271**, 1854-1857

³² Galfre, G.L., Secher, D.S. & Crawley, P.E., "Pharmaceuticals", Ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2000, pp. 1981-1999

³³ Weiner, L.M., *Semin. Oncol.*, (1999), **26**, 43-51

³⁴ Ranson, M. & Sliwkowski, M.X., *Oncology*, (2002), **63**, 17-24

estructures no-peptídiques més adequades per ser utilitzades com a fàrmac. Entre els exemples més destacats d'aquesta aproximació s'hi troben els descrits a continuació:

Inhibició de la dimerització de la proteasa del HIV-1

La proteasa dels virus de la immunodeficiència humana de tipus 1 (HIV-1), juga un paper crucial en el cicle de la vida d'aquest virus. La seva principal funció és la de tallar la cadena polipeptídica precursora de les proteïnes virals necessàries per a la infecció³⁵. És per aquesta raó, que una gran part dels fàrmacs dirigits a evitar la propagació del virus, tenen com a objectiu la inhibició de la seva funció mitjançant el reconeixement del seu centre actiu. El problema que s'ha presentat amb molts d'aquests fàrmacs, però, és que degut a la capacitat de mutació del propi virus aquest s'hi fa resistent³⁶.

Per solucionar aquest problema, actualment hi ha molts esforços dirigits a inhibir la dimerització de la proteïna, condició necessària per al seu correcte funcionament. Aquesta dimerització es dona a través dels extrems N-terminal i C-terminal de cadascun dels monòmers, els quals formen una làmina β antiparal·lela de quatre cadenes. Aquesta regió de la proteïna està altament conservada i per això s'han dissenyat abundants molècules dirigits a reconèixer un dels monòmers i així inhibir-ne la dimerització.

Un exemple força il·lustratiu d'aquesta aproximació, s'ha basat en la construcció de dues cadenes peptídiques, corresponents als extrems N-terminal i C-terminal, unides per una cadena alifàtica. Aquest compost ha demostrat ser un bon inhibidor de la dimerització³⁷. Posteriorment, l'estructura peptídica s'ha optimitzat mantenint només els aminoàcids essencials per a la interacció i introduint algun aminoàcid no natural, fins a obtenir un producte amb un tamany més adequat des del punt de vista de la química mèdica (figura 0.7)³⁸

³⁵ Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M. & Sigal, I.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1988), **85**, 4686-4690

³⁶ Deeks, S.G., Smith, M., Holodniy, M. & Khan, J.O., *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, (1997), **277**, 145-153

³⁷ Zutshi, R., Franciskovich, J., Shultz, M., Schweitzer, B., Bishop, P., Wilson, M & Chmielewski, J., *J. Am. Chem. Soc.*, (1997), **119**, 4841-4845

³⁸ Shultz, M.D., Bowman, M.J., Ham, Y.-W., Zhao, X., Tora, G. & Chmielewski, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2000), **39**, 2710-2713

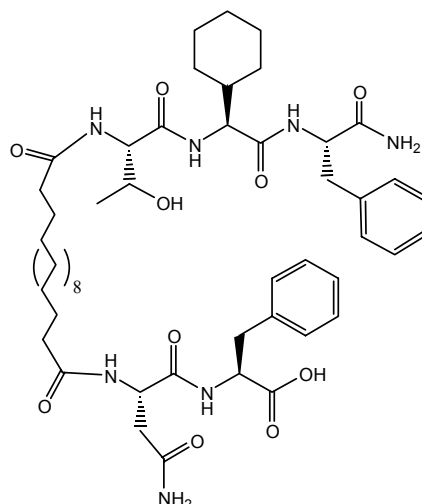


Figura 0.7 Inhibidor de la dimerització de la proteasa del HIV-1.

Inhibició de la maquinària de fusió del HIV-1

Una altra alternativa en la lluita contra el virus causant del Síndrome de Immundeficiència Adquirida (SIDA), és la inhibició de la maquinària que utilitza el virus per introduir-se en la cèl·lula. Aquest procés es produeix mitjançant una fusió entre la membrana del virus i la de la cèl·lula, controlada per les proteïnes gp120 i gp41 del virus³⁹. En aquest mecanisme de fusió, una de les etapes vitals és la formació d'un feix de sis hèlix entre els dos extrems de la proteïna gp41⁴⁰.

Una de les aproximacions basada en un pèptid de la interfase que ha estat més productiva, és la utilització d'un pèptid de 36 aminoàcids (T20), corresponent a un fragment d'una de les regions de la proteïna gp41 involucrades en la formació del feix d'hèlixs, per tal d'inhibir la fusió del virus amb la cèl·lula (figura 0.8)⁴¹.

Y-T-S-L-I-H-S-L-I-E-E-S-Q-N-Q-Q-E-K-N-E-Q-E-L-L-E-L-D-K-W-A-S-L-W-N-W-F

Figura 0.8 Seqüència del pèptid T20.

³⁹ Biscone, M.J., Pierson, T.C. & Doms, R.W., *Curr. Opin. Pharmacol.*, (2002), **2**, 529-533

⁴⁰ Chan, D.C. & Kim, P.S., *Cell*, (1998), **93**, 681-684

⁴¹ Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B. & Matthews, T.J., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, (1994), **91**, 9770-9774

optimització del pèptid mitjançant “phage display” i substitució d’alguns aminoàcids per aminoàcids no-naturals ha permès obtenir un potent inhibidor de la formació del complex p53-Hdm2 ($IC_{50} = 0,005\mu M$)⁴⁶.

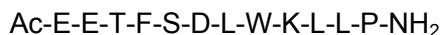


Figura 0.10 Pèptid corresponent al fragment 16-27 de la p53 capaç d’inhibir la interacció p53-Hdm2.

Estabilització de mutants del domini enllaçant d’ADN de la p53

Les mutacions en els residus claus involucrats en els contactes proteïna-proteïna, s’ha vist que és una causa força comuna de diverses malalties. Tot i això, hi ha d’altres mutacions que sense afectar els residus clau, provoquen un desestabilització de l’estructura terciària la qual també comporta una pèrdua de funcionalitat.

Per aquests últims casos, una possibilitat és la d’utilitzar lligands que siguin capaços d’interaccionar amb la forma plegada però que no interaccionin amb la forma desnaturalitzada. Així, la unió d’aquests lligands provoca un desplaçament de l’equilibri de desnaturalització/renaturalització, que a la pràctica comporta una estabilització de la forma nativa de la proteïna.

En el cas de la p53, es troba que la majoria de mutacions trobades en càncer afecten al domini enllaçant d’ADN. Per a les mutacions que afecten a l’estabilitat del domini, s’ha comprovat amb èxit la validesa de la utilització de lligands que només s’uneixin a la forma plegada per rescatar la forma funcional de la proteïna (figura 0.11)⁴⁷.

⁴⁶ Böttger, A., Böttger, V., García-Echevarría, C., Chène, P., Hochkeppel, H.-K., Sampson, W., Ang, K., Howard, S.F., Picksley, S.M & Lane, D.P, *J. Mol. Biol.*, (1997), **269**, 744-756

⁴⁷ Friedler, A., Hansson, L.O., Veprintsev, D.B., Freund, S.M.V., Rippl, T.M., Nikolova, P.V., Proctor, M.R., Rüdiger, S. & Fersht, A.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2002), **99**, 937-942

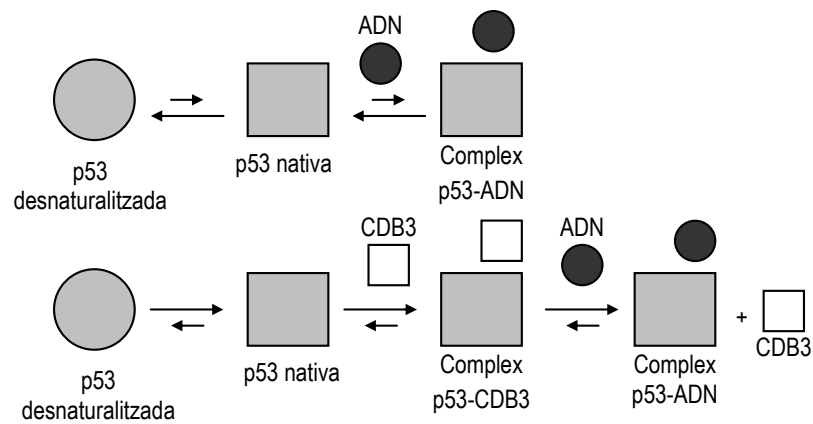


Figura 0.11 Representació del rescat de la forma funcional de la p53 mutada mitjançant el pèptid CDB3.

En aquest cas s'ha utilitzat el pèptid CDB3, corresponent a un fragment de la proteïna 53BP2, la qual s'uneix en la zona de la p53 que també reconeix l'ADN (figura 0.12). A més a més, s'ha demostrat que aquest pèptid estabilitza la forma plegada però sense competir amb l'ADN, ja que aquest interacciona amb la p53 molt més fortament i en desplaça el pèptid.

R-E-D-E-D-E-I-E-W-NH₂

Figura 0.12 Seqüència del pèptid CDB3.

Tot i l'èxit dels casos presentats basats en la utilització dels pèptids de la interfase, aquesta estratègia presenta una sèrie de limitacions. La primera, és que en certs casos és possible que el lligand peptídic sí que competeixi amb el lligand natural de la proteïna i això n'afecti la funcionalitat. La segona i més important, és que aquesta metodologia està limitada a la búsqueda de pèptids que reconeixin superfícies de les quals ja se'n coneix una proteïna que hi interacciona, i per tant no és vàlida quan es vol reconèixer una superfície per la qual no se'n coneix cap.

0.2.5 LLIGANDS DE DISSENY

Considerant totes les limitacions inherents de les estratègies presentades per al descobriment de lligands de superfícies proteiques, el millor seria disposar de les eines que, per a qualsevol superfície donada, permetessin dissenyar un lligand capaç de interaccionar-hi eficaçment.

El problema, és que tenint en compte els pocs exemples de lligands de superfícies proteiques acumulats en la bibliografia, encara no es coneixen aquestes eines, i per això una de les estratègies

que presenta més dificultats és el disseny *de novo*. Tot i aquestes dificultats però, s'han fet avenços significatius, sobretot en el camp del reconeixement de petits pèptids model, que obren la porta a poder començar a dissenyar lligands capaços d'interaccionar amb superfícies proteiques.

0.2.5.1 Reconeixement de pèptids model

Alguns dels primers exemples de lligands capaços de reconèixer pèptids apareguts en la literatura, es basen en el reconeixement de petits pèptids sense una estructura secundària clara. Així, entre els exemples més il·lustratius s'hi troba el reconeixement de pèptids amb dues fenilalanines mitjançant dímers de β -ciclodextrines⁴⁸. D'altres exemples, es basen en lligands capaços de reconèixer grups funcionals de diferent caràcter, com és el reconeixement del tripèptid Gly-Trp-Gly amb un lligand que incorpora un éter corona, un grup hidrofòbic i un grup alquilamoni⁴⁹.

Avui en dia, però, també es poden trobar exemples de lligands que incorporen un segon nivell de selectivitat, és a dir lligands que interaccionen amb pèptids amb una conformació secundària concreta.

Donada la importància de les interaccions entre hèlix- α en els contactes proteïna-proteïna i a l'abundant presència de carboxilats en la superfície de les proteïnes, en el nostre grup, en col·laboració amb els grups del Dr. de Mendoza i del Dr. Hamilton, fa uns anys es va començar a explorar la interacció del compost tetraguanidínic **1** amb hèlixs- α riques en carboxilats⁵⁰ (figura 0.13).

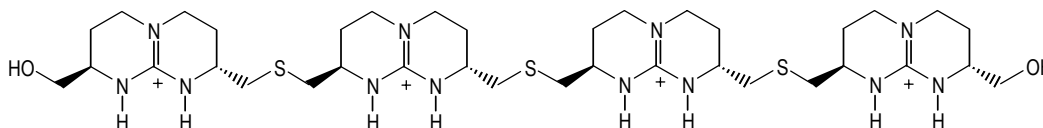


Figura 0.13 Compost tetraguanidínic 1.

La idea de dur a terme aquests estudis va sorgir de tres observacions prèvies: d'una banda s'havia trobat que certes molècules amb guanidinis bicíclics podien reconèixer els carboxilats d'alguns aminoàcids⁵¹, i de l'altra, s'havia trobat que molècules amb dos grups guanidini reconeixien selectivament els carboxilats d'un pèptid en hèlix- α amb dos residus d'aspàrtic en i / $i+3$ ⁵². Per últim,

⁴⁸ Breslow, R., Yang, Z., Ching, R., Trojandt, G. & Odobel, F., *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), **120**, 3536-3537

⁴⁹ Hossain, M.A. & Schneider, H.J., *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), **120**, 11208-11209

⁵⁰ Peczu, M.W., Hamilton, A.D., Sánchez-Quesada, J., de Mendoza, J., Haack, T. & Giralt, E., *J. Am. Chem. Soc.*, (1997), **119**, 9327-9328

⁵¹ Galán, A., Andreu, D., Echevarren, A.M., Prados, P. & de Mendoza, J., *J. Am. Chem. Soc.*, (1992), **114**, 1511-1512

⁵² Albert, J.S., Goodman, M.S. & Hamilton, A.D., *J. Am. Chem. Soc.*, (1995), **117**, 1143-1144

s'havia comprovat que el compost tetraguanidínic **1**, en presència de sulfats formava una doble hèlix al seu voltant⁵³.

Així doncs, en aquests primers estudis es va decidir avaluar la interacció del compost tetraguanidínic **1** amb un pèptid amb una conformació d'hèlix- α i quatre residus d'aspàrtic distribuïts en una periodicitat de $i / i+3$, podent-se concloure que la interacció era clara ($K_A \approx 10^5$) i provocava una estabilització de l'estructura secundària del pèptid.

En estudis posteriors, es va posar de manifest la necessitat que el pèptid adoptés una conformació d'hèlix- α per que es pogués donar la interacció. Aquest fet, va permetre concloure que no només es donava el reconeixement de quatre grups funcionals, sinó que també es reconeixia una ordenació en l'espai determinada (figura 0.14)⁵⁴.

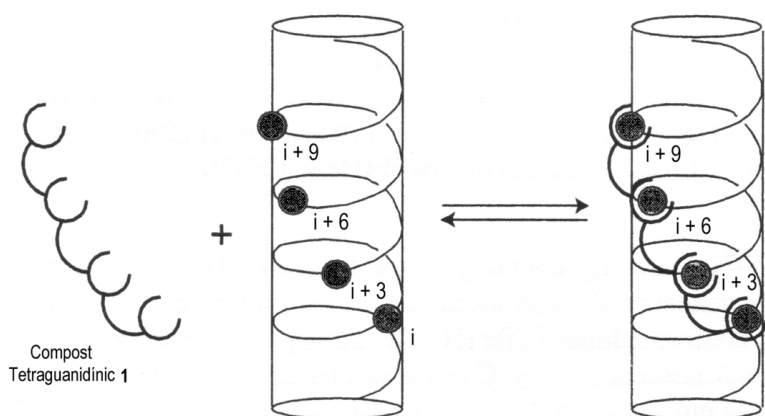


Figura 0.14 Representació del reconeixement del pèptid en hèlix- α per part del compost tetraguanidínic **1**.

Posteriorment, també es va poder comprovar que aquesta interacció es podia donar independentment que els quatre residus àcids fossin d'àcid aspàrtic, d'àcid glutàmic o de combinacions dels dos⁵⁵. A més a més, es va poder augmentar l'afinitat pràcticament dos ordres de magnitud mitjançant la introducció de quatre residus de triptòfan en el pèptid (figura 0.15)⁵⁶. Aquests residus es van situar de manera que es potenciés la interacció π -catió entre els grups guanidini i els corresponents triptòfans.

⁵³ Sánchez-Quesada, J., Seel, C., Prados, P., de Mendoza, J., Dalcol, I. & Giralt, E., *J. Am. Chem. Soc.*, (1996), **118**, 277-278

⁵⁴ Haack, T., Pecuh, M.W., Salvatella, X., Sánchez-Quesada, J., de Mendoza, J., Hamilton, A.D. & Giralt, E., *J. Am. Chem. Soc.*, (1999), **121**, 11813-11820

⁵⁵ Salvatella, X., Pecuh, M.W., Gairí, M., Jain, R.K., Sánchez-Quesada, J., de Mendoza, J., Hamilton, A.D. & Giralt, E., *Chem. Commun.*, (2000), 1399-1400

⁵⁶ Omer, B.P., Salvatella, X., Sánchez-Quesada, J., de Mendoza, J., Giralt, E. & Hamilton, A.D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2002), **41**, 117-119

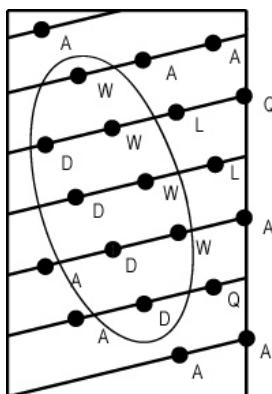


Figura 0.15 Seqüència del pèptid i projecció de l'hèlix- α mostrant els residus amb els quals interacciona el compost tetraguanidínic 1.

0.2.5.2 Reconeixement de superfícies proteiques

En la bibliografia, es poden trobar alguns casos de lligands petits dissenyats per a interaccionar amb la superfície d'una determinada proteïna. Un exemple clar, és el d'un petit lligand mimètic de la proteïna A dissenyat per a purificar immunoglobulines⁵⁷.

Gràcies als coneixements adquirits en la comprensió de les làmines β , avui en dia es disposen de diferents maneres de dur-ne a terme el seu disseny⁵⁸. Així, es poden trobar alguns exemples de lligands basats en aquesta estructura secundària que són capaços de reconèixer superfícies proteiques, com per exemple inhibidors de la proteasa del HIV-1⁵⁹.

Tot i això, un dels casos més espectaculars és el descrit pel grup del Dr. Hamilton. En la seva aproximació al reconeixement de superfícies proteiques, en aquest grup s'han inspirat amb el sistema immune. Així doncs, s'han basat en la part dels anticossos que interacciona amb els antigens (FAB) per dissenyar unes bastides (o "scaffolds") de calix[4]arè en les quals s'hi poden unir quatre pèptids cíclics que mimetitzen els de la superfície del FAB (figura 0.16)⁶⁰.

⁵⁷ Li, R., Dowd., V., Stewart, D.J., Burton, S.J. & Lowe, C.R., *Nat. Biotechnol.*, (1998), **16**, 190-195

⁵⁸ Pastor, M.T. & Pérez-Payá, E., *Mol. Divers.*, (2003), **6**, 149-155

⁵⁹ Smith III, A.B., Hirschmann, R., Pasternak, A., Guzman, M.C., Yokoyama, A., Sprengler, P.A.; Drake, P.L., Emini, E.A. & Schleif, W.A., *J. Am. Chem. Soc.*, (1995), **117**, 11113-11123

⁶⁰ Hamuro, Y. Calama, M.C., Park, H.S. & Hamilton, A.D., *Angew. Chem. Int. Ed.* (1997), **36**, 2680-2683

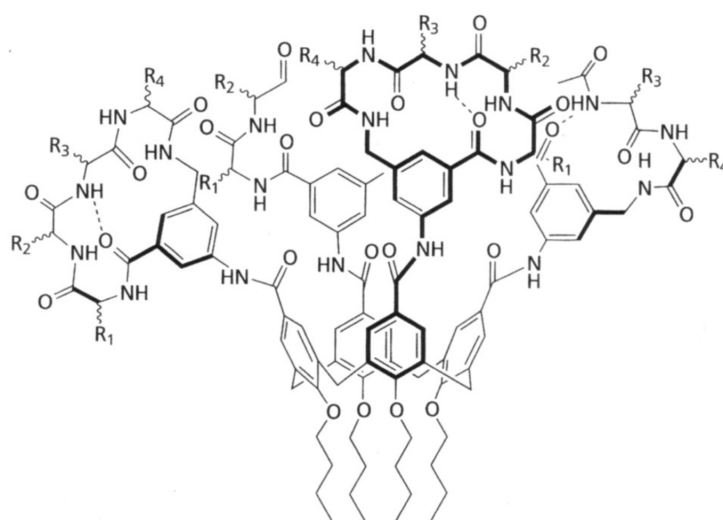


Figura 0.16 Estructura del mimètic del FAB.

Mitjançant la utilització de diferents pèptids cíclics, han utilitzat amb èxit aquest tipus d'estructura en el reconeixement de diverses superfícies. Un dels exemples més clars, és la inhibició de la interacció entre el citocrom *c* (Cc) i la seva peroxidasa (CcP)⁶¹. En aquest cas, reconeixen la superfície del citocrom, rica en lisines i arginines, mitjançant la utilització de pèptids cíclics rics en glicina i àcid aspàrtic.

Donats els excel·lents resultats obtinguts en la interacció dels pèptids model amb el compost tetraguanidínic **1**, en el nostre grup es va plantejar la possibilitat d'utilitzar aquest lligand per al reconeixement de superfícies proteiques que en la seva superfície presentessin motius tetraaniònics formats per quatre residus àcids en una hèlix- α i distribuïts en una periodicitat de $i / i+3 / i+6 / i+9$.

Per tal d'escollir una proteïna en la qual poder assajar aquesta possibilitat, es va fer una exploració de les bases de dades (RCSB Protein Data Bank) en busca de proteïnes que complissin aquesta condició. Aquestes, posteriorment es van classificar en funció de l'accessibilitat al solvent dels diferents residus àcids i de l'helicitat de l'hèlix corresponent⁶². En aquesta classificació, la proteïna que va presentar un millor resultat va ser el domini de tetramerització de la proteïna supressora de tumors p53, la qual en la seva superfície presenta el motiu tetraaniònic format pels residus E343, E346, E349 i D352.

⁶¹ Wei, Y., McLendon, G.L., Hamilton, A.D., Case, M.A., Purring, C.B., Lin, Q., Park, H.S., Lee, C.-S. & Yu, T., *Chem. Commun.*, (2001), 1580-1581

⁶² Salvatella, X., Haack, T., Gairí, M., de Mendoza, J., Pecuh, M.W., Hamilton, A.D. & Giralt, E., in Pons, M. (Ed), "NMR in Supramolecular Chemistry", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999, pp. 267-280

Recentment, s'ha pogut demostrar que efectivament el compost tetraguanidínic **1** és capaç de reconèixer la superfície del domini de tetramerització amb una afinitat moderada⁶³.

0.3 P53

Des del seu descobriment al 1989, la p53 ha centrat l'interès de molts grups de recerca arreu del món, fet clarament detectable en la immensa quantitat de publicacions en les que ha aparegut (>20.000 en aquests 15 anys). D'altra banda, el paper cabdal que juga aquesta proteïna en el manteniment de la integritat dels gens, li ha valgut el sobrenom del "guardià del genoma"⁶⁴.

De fet, es troba que en el 50% dels càncers humans, aquesta proteïna està mutada i que en molts altres està desactivada indirectament, tant per la mutació de les proteïnes que hi interaccionen directament com per la unió de proteïnes virals. A més a més, molts d'aquests casos de càncer són altament agressius i presenten una elevada resistència a tractaments com la quimioteràpia o la radioteràpia⁶⁵.

0.3.1 ESTRUCTURA I FUNCIO

La forma activa de la p53, és un homotetràmer format per monòmers de 393 aminoàcids en els quals s'hi poden diferenciar quatre dominis: el domini d'activació transcripcional, el domini enllaçant d'ADN, el domini de tetramerització i el domini regulador (figura 0.17)⁶⁶.

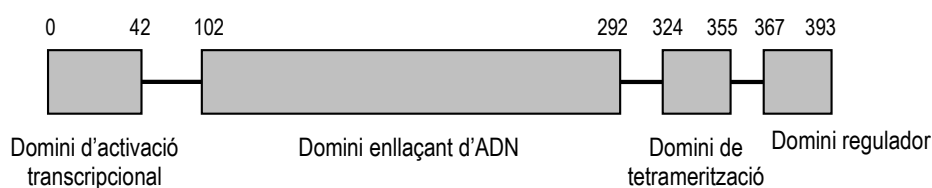


Figura 0.17 Representació dels diferents dominis de la p53.

⁶³ Salvatella, X., Martinell, M., Gairí, M., Mateu, M.G., Feliz, M., Hamilton, A.D., de Mendoza, J. & Giralt, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2004), **43**, 196-198

⁶⁴ Lane, D.P., *Nature*, (1992), **358**, 15-16

⁶⁵ Bullock, A.N. & Fersht, A.R., *Nat. Rev. Cancer*, (2001), **1**, 68-76

⁶⁶ Levine, A.J., *Cell*, (1997), **88**, 323-331

Quan una cèl·lula està sotmesa a situacions d'elevat estrès, es detecta un augment substancial de la concentració de p53, la qual provoca una aturada del cicle cel·lular⁶⁷. Entre les situacions d'estrès que provoquen aquesta activació de la p53, s'hi troben (figura 0.18):

- 1- *Danys en l'ADN*. Provoquen una activació dependent de les quinases ATM, Chk1 i Chk2.
- 2- *Senyals de creixement aberrant*, com el que es produeix en la sobreexpressió dels oncogens Ras i Myc. Aquesta via d'activació, procedeix a través de la proteïna p14.
- 3- *Quimioteràpia, radioteràpia o inhibició de les quinases*. En aquest cas el mecanisme d'activació depèn de les quinases ATR i CKII.

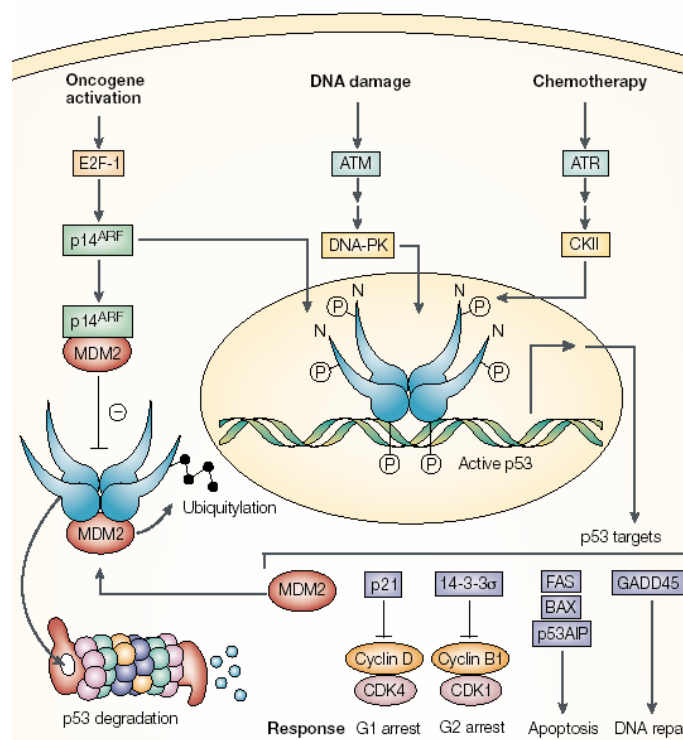


Figura 0.18 Esquema de la funció i regulació de la p53⁶⁵.

La funció de la p53 ve regulada per la proteïna MDM2, la qual en provoca la degradació. En aquest procés de regulació, la MDM2 s'uneix a l'extrem N-terminal de la p53 i en promou l'ubiquitinació. Les diverses còpies d'Ubiquitina unides a la p53, actuen com a bandera per a la maquinària de degradació de la cèl·lula, la qual reconeix la p53 i la degrada. La p53 al seu torn, és l'encarregada d'activar la transcripció de la proteïna MDM2, de manera que tot el procés de regulació queda tancat en un cicle o "feedback loop".

⁶⁷ Vogelstein, B., Lane, D.P. & Levine, A.J., *Nature*, (2000), **408**, 307-310

De fet, els diferents mecanismes d'activació de la p53 el que realment provoquen és una inhibició de la interacció p53-MDM2. Així, en el cas de la via d'activació controlada per la proteïna p14, aquesta s'uneix a la MDM2 evitant que pugui reconèixer la p53, i en el cas de les vies controlades per quinases, aquestes fosforilen la p53 bloquejant també el possible reconeixement per part de la MDM2.

La p53, realment és un factor de transcripció que un cop activat promou l'expressió d'una sèrie de gens que codifiquen proteïnes que actuen sobre diferents mecanismes cel·lulars. Aquests gens es poden classificar en quatre categories en funció de l'efecte que promouen (figura 0.18):

- 1- *Aturada del cicle cel·lular.* Un exemple d'aquest gens, és el p21^{WAF1/CIP1}, el qual inhibeix les ciclines dependents de quinases.
- 2- *Apoptosi.* En els casos de major estrès, la p53 pot activar la transcripció de gens que provoquen el suïcidi cel·lular, com són els gens pro-apoptòtics Bax i p53AIP1, o els que codifiquen per receptors tipus "death-signal" com el Fas.
- 3- *Estabilitat genètica.* Aquí s'hi inclouen tots els gens que codifiquen la maquinària encarregada de la reparació de l'ADN, com per exemple el GADD45.
- 4- *Inhibició de l'angiogènesi.* Degut al desmesurat creixement del tumors, aquests necessiten formar al seu voltant vasos sanguinis que els hi aportin els nutrients necessaris. No es coneix molt bé com, però sembla que la p53 també pot estar involucrada en la inhibició d'aquest procés.

Per poder realitzar totes aquestes funcions, la p53 està àmpliament regulada per modificacions covalents i per altres proteïnes que hi interaccionen⁶⁸. De fet, avui en dia encara no es té una comprensió total del seu funcionament, ja que qualsevol explicació hauria de ser capaç de contemplar la multitud de versions diferents de la pròpia proteïna que poden estar presents al mateix temps en la cèl·lula⁶⁹.

Pel que fa a les mutacions trobades en els diferents tipus de càncer, s'ha vist que en la majoria de casos aquestes afecten a l'habilitat de la proteïna de reconèixer seqüències específiques d'ADN. Aquesta pèrdua de funcionalitat en general es pot donar mitjançant els següents tipus de mutacions⁷⁰:

- 1- Mutacions en el domini enllaçant d'ADN que afecten l'estabilitat termodinàmica del domini.
- 2- Mutacions en el domini enllaçant d'ADN que afecten al residu involucrats en els contactes ADN-p53.

⁶⁸ Jayaraman, L. & Prives, C., *Cell. Mol. Life Sci.* (1999), **77**, 76-87

⁶⁹ Prives, C. & Hall, P.A., *J. Pathol.*, (1999), **187**, 112-126

⁷⁰ Lane, D.P. & Hupp, T.R., *Drug Discov. Today*, (2003), **8**, 347-355

- 3- Mutacions que afecten l'activació via proteases.
- 4- Mutacions que desplacen l'equilibri tetràmer-monòmer cap a la forma monomèrica.

A més a més, la p53 es pot veure desactivada per la unió de proteïnes virals. Alguns virus, en introduir-se a la cèl·lula, provoquen un augment de la proliferació cel·lular, que la cèl·lula compensa amb un augment de l'expressió de la proteïna p14, la qual activa la p53 i per tant, atura la proliferació. En aquests casos, alguns virus contraataquen mitjançant l'expressió de proteïnes que s'uneixen a la p53 i la inactiven, fet que predisposa a les cèl·lules a convertir-se en tumorals (figura 0.19).

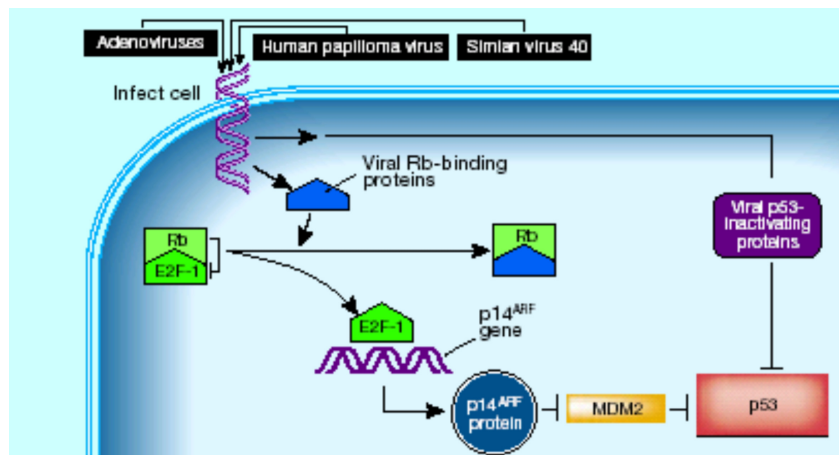


Figura 0.19. Inhibició de la p53 via proteïnes virals⁶⁷.

Aquest paper clau en el desenvolupament dels tumors, és el que ha fet que avui en dia la p53 sigui una de les possibles dianes terapèutiques més estudiades en la recerca contra el càncer. No s'ha d'oblidar però, que hi ha d'altres malalties que també són degudes a disfuncions en els mecanismes apoptòtics de la cèl·lula⁷¹. Entre aquestes, s'hi troben algunes malalties neurodegeneratives, la diabetis tipus 1 i certs processos inflamatoris. Així doncs, qualsevol molècula que fos capaç de modular aquests mecanismes podria ser extremadament interessant.

0.3.2 DOMINI DE TETRAMERITZACIÓ

El domini de tetramerització de la p53 és un homotetràmer que es pot descriure com un dímer de dímers, en el qual cada dímer primari està format per dos monòmers que interaccionen entre sí a través

⁷¹ Reed, J.C., *Nat. Rev. Drug Discov.*, (2002), 1, 111-121

de contactes entre les hèlix i la formació d'un petit full- β . Els dímers, s'uneixen entre sí en una disposició ortogonal en la qual les quatre hèlix formen un nucli hidrofòbic molt estable (figura 0.20)⁷².

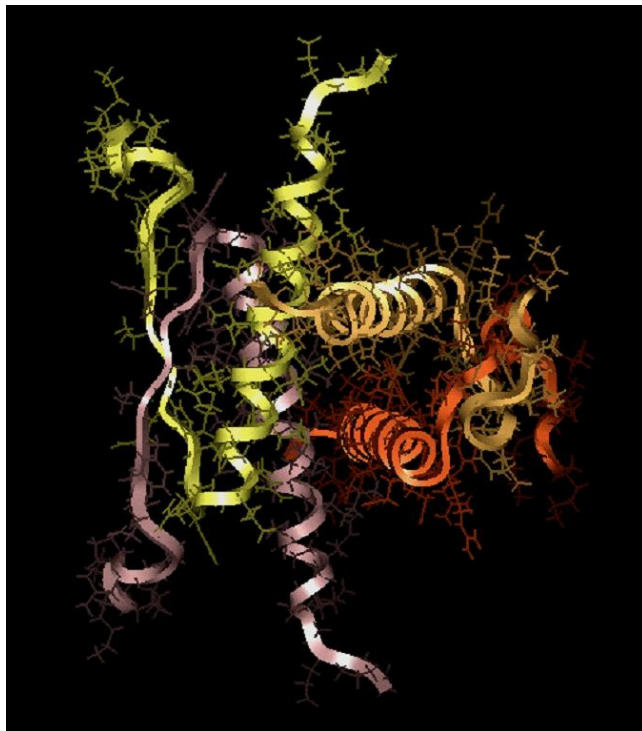


Figura 0.20. Estructura del domini de tetramerització de la p53.

Tot i que models de p53 sense aquest domini són capaços d'unir ADN, s'ha vist que aquest domini és vital per al correcte funcionament de la proteïna ja que només la forma tetramèrica és activa⁷³.

Si s'analitzen, però, els diferents casos de càncer, es troba que les mutacions en aquest domini són relativament poc freqüents. Aquest fet es pot explicar tenint en compte com afecten les mutacions en funció del domini de la proteïna⁷⁴. D'una banda, les mutacions en el domini de tetramerització, en general, només provoquen la desactivació de la proteïna com a conseqüència de la desestabilització del tetràmer. Per contra, mutacions en altres parts de la proteïna s'ha vist que no només poden desactivar la p53, sinó que a més a més poden fer que la p53 adquireixi propietats oncogèniques, augmentant així les possibilitats de desenvolupar un tumor. Sembla doncs, que la presència de la proteïna tetràmerica inactiva és més perjudicial que la seva absència. Tenint en compte aquest fenomen, es pot pensar que

⁷² Clore, G.M., Ernst, J., Clubb, R., Omichinski, J.G., Kennedy, W.M.P., Sakaguuchi, K., Appella, E. & Gronenborn, A.M., *Nat. Struct. Biol.*, (1995), **2**, 321-333

⁷³ Chène, P., *Oncogene*, (2001), **20**, 2611-2617

⁷⁴ Chène, P. & Bechter, E., *J. Mol. Biol.*, (1999), **286**, 1269-1274

en els tumors se seleccionen les mutacions que comporten aquest efecte negatiu extra respecte les que només desactiven la proteïna.

Tot i això, se sap que la funció de la p53 està regulada per l'estructura tetramèrica i per la seva capacitat de produir certs canvis conformacionals⁷⁵, de manera que qualsevol lligand que fos capaç de reconèixer el domini de tetramerització tindria unes expectatives prometedores.

0.4 OBJECTIUS

El domini de tetramerització de la p53 és un molt bon model per explorar el reconeixement de motius tetraaniònics mitjançant molècules oligoguanidíniques, i a més a més el reconeixement de la seva superfície obre les portes a possibles aplicacions terapèutiques. Per tot això, en aquesta tesi s'ha decidit estudiar aquesta possible interacció.

Tot i els resultats prometedors obtinguts amb el compost tetraguanidínic **1**, en aquesta tesi l'objectiu principal ha estat poder reconèixer la superfície del domini de tetramerització de la p53 amb lligands peptídics ja que aquests ofereixen la possibilitat d'explorar una major diversitat química al nivell de les cadenes laterals. Aquesta major diversitat, pot permetre no només trobar un bon lligand, sinó també aprofundir en quins són els factors que governen el reconeixement de superfícies proteiques.

Així doncs, per dur a terme aquest treball s'han plantejat els següents objectius:

- 1- Posar a punt la metodologia que permeti expressar i purificar el domini de tetramerització de la p53 en el nostre laboratori.
- 2- Mitjançant eines de modelat molecular, dissenyar un pèptid que sigui capaç de reconèixer el motiu tetraaniònic del domini de tetramerització de la p53.
- 3- Explorar diferents metodologies per tal de caracteritzar la interacció entre el lligand peptídic i el domini de tetramerització.
- 4- Establir la metodologia més adient per avaluar i comparar la interacció del domini amb un nombre relativament elevat de lligands.
- 5- Optimitzar l'afinitat del lligand peptídic mitjançant eines de química combinatòria.
- 6- Aportar noves idees que permetin aprofundir en la comprensió bàsica dels processos de reconeixement de superfícies proteiques.

⁷⁵ Halazonetis, T.D. & Kandil, A.N., *EMBO J.*, (1993), **12**, 5057-5064

