

Biologia química: la química com a eina en estudis biològics *Chemical biology: Chemistry as an essential tool in biology*

Gemma Triola

Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC, CSIC). Departament de Química Biomèdica

Resum: La biologia química, entesa com l'ús d'eines químiques per a l'estudi de fenòmens biològics, ha esdevingut una disciplina fonamental per a investigar les funcions de les proteïnes, el seu paper dins les complexes xarxes de senyalització cel·lular, per a la identificació de noves dianes terapèutiques i, en definitiva, per a estudiar les bases moleculars que regulen els processos biològics, tant en condicions normals com patològiques. En aquest article es detallen mitjançant alguns exemples les característiques d'aquesta àrea de recerca multidisciplinària, que comprèn la química orgànica, la biologia molecular, cel·lular i estructural o la biofísica, i se centra, entre d'altres, en el disseny de molècules amb capacitat per a modular l'activitat i les interaccions de les proteïnes, la síntesi de sondes fluorescents o el desenvolupament de mètodes químics per a la síntesi, modificació i immobilització de proteïnes.

Paraules clau: Química biològica, reaccions bioortogonals, síntesi i modificació de proteïnes, proteïnes Ras.

Abstract: *Chemical biology relies on the use of chemical tools for the characterization of biological processes. In the last decade, this multidisciplinary research area involving organic chemistry as well as molecular, cellular and structural biology and biophysics, among other fields, has played a key role in the identification of protein function and its importance in complex cellular signalling networks and especially in the elucidation of the molecular principles regulating biological processes in both health and disease. This paper presents some examples and describes some of the major research areas in chemical biology, including the design and synthesis of molecules to modulate protein activity and interactions, the synthesis of fluorescent reporters and the development of chemical methods enabling protein synthesis, modification and immobilization.*

Keywords: *Chemical biology, bioorthogonal reactions, protein synthesis and modification, Ras proteins.*

Introducció

El gran avenç viscut en els últims anys en l'estudi de processos biològics, tant a nivell cel·lular com, sobretot, a nivell molecular, no hauria estat possible sense la contribució de la química orgànica i, més concretament, de la biologia química. Entenem per *biologia química* l'ús de mètodes i estratègies químiques com a eina per a investigar, manipular i entendre els processos biològics. Aquesta disciplina, amb arrels en la química bioorgànica i en la qual ja havien treballat grans científics com Emil Fischer, Linus Pauling o Har Gobind Khorana, ha ressorgit en els últims anys i s'ha convertit en un camp emergent i interdisciplinari que requereix la col·laboració de la química orgànica, la biologia molecular, cel·lular i estructural, la farmacologia o la biofísica. Com a resultat, la biologia química s'estén en diferents àrees, entre les quals destaquen el disseny de molècules amb capacitat per a modular, tant positivament com negativa, l'activitat de les proteïnes, la

síntesi de sondes fluorescents que facilitin l'estudi de fenòmens biològics mitjançant microscòpia de fluorescència o el desenvolupament de mètodes químics que permetin la síntesi, modificació i immobilització de proteïnes per tal de caracteritzar la seva funció, estudiar les interaccions o crear nous mètodes de diagnòstic.

Existeix una certa confusió en la denominació actual d'aquesta disciplina, a causa, sobretot, de les terminologies emprades en els diferents idiomes. Així, doncs, mentre que aquesta àrea de recerca és coneguda en el nostre país com a *química biològica*, en el món anglosaxó es coneix com a *chemical biology* i, per tant, s'hauria de traduir més acuradament com a *biologia química*. Un dels motius més importants d'aquest fet és que la denominació *química biològica* (*biological chemistry*) es confon fàcilment amb la de *bioquímica* (*biochemistry*), l'estudi a nivell molecular dels processos químics que es produeixen en cèl·lules vives. De fet, ambdós termes poden ser considerats redundants, ja que *química biològica* no és res més que la forma antiga de denominar la *bioquímica* actual. Per aquest motiu, en aquest article s'utilitzarà el terme *biologia química* per a descriure aquesta àrea de recerca centrada en l'ús d'eines químiques per a estudiar i resoldre problemes biològics.

Tot i els grans avenços viscuts en l'última dècada en el camp de la biologia química, queda encara un llarg camí per endavant, sobretot pel que fa a l'estudi de la funció i les interaccions de les proteïnes cel·lulars. La seqüenciació del genoma humà completada ara fa una dècada va generar moltes expectatives. Es creia que aquella gran quantitat d'informació suposaria una revolució tant en el nostre coneixement sobre les proteïnes com en el desenvolupament de nous mètodes terapèutics. En alguns casos ha estat realment així i la informació obtinguda ha resultat essencial per a la caracterització de processos biològics. Malauradament, però, actualment som conscients que la informació proporcionada pel genoma és del tot insuficient, si desconeixem la funció de les proteïnes que codifiquen els gens estudiats. A més, les proteïnes es troben generalment incloses en complexes xarxes dinàmiques que s'encarreguen de la regulació de nombroses vies de senyalització cel·lular. L'estudi global d'aquestes xarxes i el desenvolupament de molècules petites capaces de modular-les de manera reversible serà una important àrea de recerca en el futur en la qual la biologia química de sistemes (*systems chemical biology*) està començant a proporcionar informació de gran interès. A més, l'existència de senyals epigenètics o modificacions posttraduccionals de proteïnes (fosforilació, acetilació, lipidació, etc.), que en la majoria dels casos no poden ser predites a partir de l'estudi de la seqüència genòmica, complica encara més l'estudi de les proteïnes. En aquest context, la biologia química té un paper crucial en permetre la síntesi de proteïnes modificades posttraduccionament, així com la caracterització de la seva funció i l'estudi de la seva interacció amb altres proteïnes i, per tant, en obtenir informació essencial que podrà ser utilitzada posteriorment amb finalitats terapèutiques.

Síntesi i modificació de proteïnes

La síntesi de proteïnes ha estat un dels objectius més ambiciosos dels químics en les últimes dècades, ja que no només permet obtenir proteïnes, sinó també la incorporació d'aminoàcids no naturals, de modificacions posttraduccionals, de grups fluoròfors o de marcatges per afinitat que facilitin el seu estudi. Un pas molt important en aquesta direcció va ser l'establiment per part del grup de Stephen Kent del mètode de lligació química nativa (*native chemical ligation*, NCL) [1], basat en la unió de dos precursors peptídics mitjançant un enllaç de tipus amida (figura 1). Per a dur-se a terme la reacció, cal que un

dels pèptids contingui un residu de cisteïna en l'extrem N-terminal i l'altre pèptid, obtingut generalment per mètodes de síntesi en fase sòlida, un tioèster en el seu extrem C-terminal. La formació de l'enllaç amida s'inicia per atac del grup sulfhidril de la cisteïna al tioèster a través d'una reacció de transtioesterificació, i el nou tioèster format pateix espontàniament una reacció de transposició acil S-N per donar lloc a un enllaç amida irreversible. L'aplicació d'aquesta estratègia ha permès la síntesi de nombroses proteïnes de mida considerable.

Posteriorment, Muir i col·laboradors van ampliar l'ús d'aquesta tecnologia amb el desenvolupament de l'anomenada *lligació de proteïnes expressades* (*expressed protein ligation*, EPL), en la qual el fragment que conté el tioèster C-terminal s'obté mitjançant tècniques d'expressió de proteïnes basades en inteïnes, i no per mètodes químics [2]. Les inteïnes són segments proteics amb capacitat per a autoprocessar-se. L'autoprocessament es produeix a causa de la presència en la posició N-terminal de la inteïna de residus de cisteïna, serina o treonina, que participen en reaccions nucleòfiles. Un dels mètodes més emprats per a la generació de tioèsters de proteïna és el vector IMPACT (*inteïn-mediated purification with an affinity chitin-binding tag*), on la proteïna que es vol expressar es fusiona a una inteïna modificada i a un domini addicional d'unió a quitines que facilita la purificació final. El mecanisme de formació del tioèster s'inicia amb un rearranjament acil N-S/O entre el residu de cisteïna, serina o treonina i l'aminoàcid C-terminal de la proteïna d'interès, la qual cosa dóna lloc a un èster o tioèster reactiu. El seu tractament amb un tiol (com el mercaptoetansulfonat de sodi, MesNa) provoca una transtioesterificació i l'alliberament de la proteïna desitjada en forma de tioèster C-terminal. Finalment, la reacció de la proteïna tioèster amb un pèptid que tingui una cisteïna N-terminal dóna lloc a una proteïna semisintètica o modificada (figura 2).

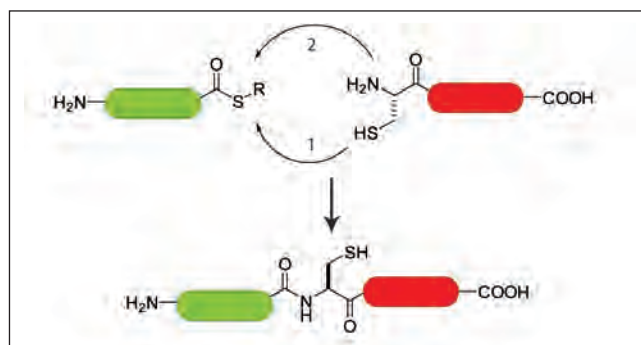


FIGURA 1. Lligació química nativa per a la síntesi de proteïnes.

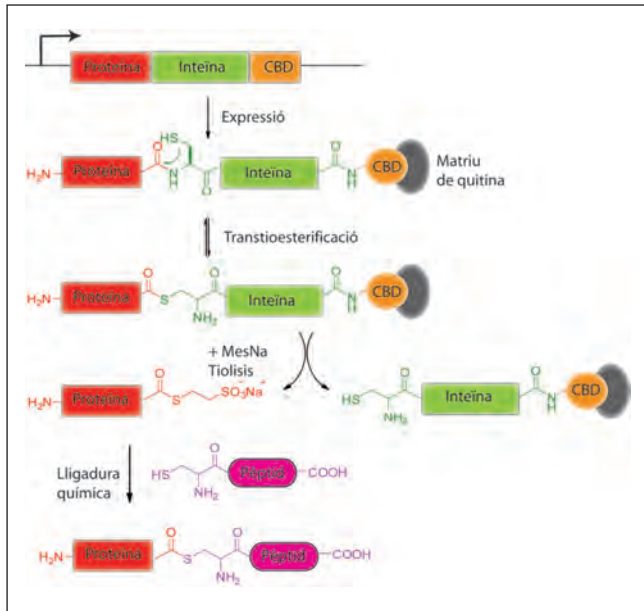


FIGURA 2. La lligació de proteïnes expressades es basa en la generació d'un tioèster de proteïna i la seva reacció amb un pèptid que presenta una cisteïna en el seu extrem N-terminal.

Modificació selectiva de proteïnes

Reaccions bioortogonals

L'establiment de la tècnica de lligació de proteïnes expressades juntament amb els avenços en la generació dels vectors necessaris, com ara el vector IMPACT, no només ha permès la generació de proteïnes semisintètiques, sinó que també ha contribuït enormement a la seva modificació selectiva. S'han descrit nombrosos mètodes químics per a la modificació de proteïnes [3]. Alguns es basen en la reactivitat de les cadenes laterals dels aminoàcids (els grups amino de lisines reaccionen amb àcids activats en forma d'hidroxisuccinimida, i els tiols de cisteïnes reaccionen amb grups maleimido) i, per tant, marquen les proteïnes aleatòriament afectant un o més residus i resultant en mesclades complicades de productes. Altres estratègies més recomanables es basen en la introducció prèvia de nous grups funcionals, com ara azidoalanines o els tioèsters C-terminals esmentats anteriorment i la seva posterior modificació selectiva mitjançant reaccions bioortogonals, reaccions químiques compatibles amb l'estructura secundària i els grups funcionals de les biomolècules. Aquestes reaccions han de complir una sèrie de requisits: han de ser reaccions ràpides, que poden dur-se a terme en aigua o solucions tampó, que transcorren a pH neutres i temperatura ambient i no so-

len requerir l'ús de catalitzadors de tipus metall que puguin ser tòxics per a les proteïnes. Un dels exemples més coneguts de les reaccions bioortogonals és la cicloaddició de Huisgen d'azides i alquins catalitzada per coure, també coneguda com a *click chemistry*, desenvolupada paral·lelament per Sharpless i Meldal l'any 2002 [4, 5]. Posteriorment, Carolyn Bertozzi va desenvolupar una versió que no requeria l'ús de coure utilitzant alquins cíclics altament tensionats [6]. Una altra reacció bioortogonal àmpliament utilitzada per a la modificació de proteïnes ha estat la lligació de Staudinger basada en la reducció d'azides amb fosfines, desenvolupada per Hermann Staudinger a principi del segle xx [3].

La modificació selectiva de proteïnes també pot aconseguir-se mitjançant mètodes basats en la formació de complexos d'elevada afinitat. Per exemple, l'ús de níquel permet la modificació de proteïnes que presenten cues d'histidina, tot i que el complex histidina-níquel resultant és poc estable a causa de la baixa afinitat entre ambdós. Aquesta limitació quedaria resolta amb l'ús del complex (*strept*)avidina-biotina amb una afinitat tan elevada que es comporta pràcticament com un enllaç covalent. En aquest cas, però, cal una biotinitiació prèvia de la proteïna mitjançant mètodes químics o enzimàtics que pot afectar la seva funcionalitat, si es fa de manera aleatòria i es biotinititzen residus implicats en el centre actiu.

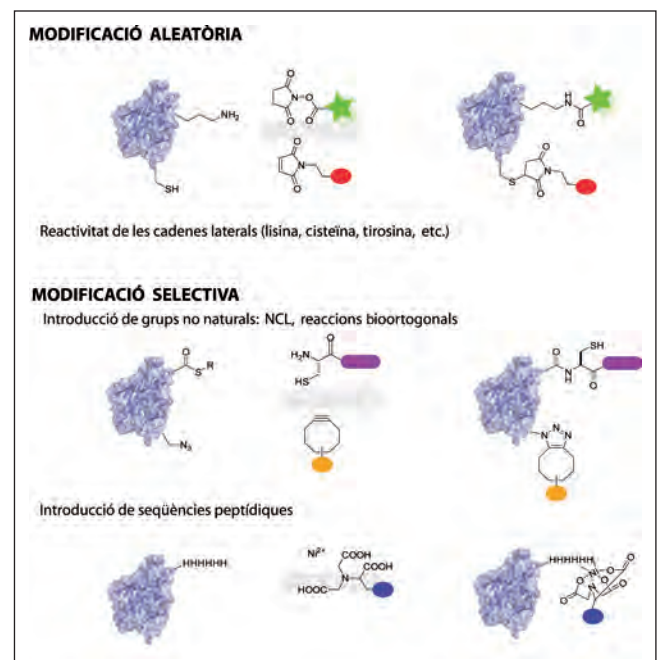


FIGURA 3. Mètodes per a la modificació aleatòria o selectiva de proteïnes.

Nous mètodes bioortogonals per a la modificació selectiva de proteïnes: la lligació oxiamina

Tot i els importants exemples descrits anteriorment, encara és necessari el desenvolupament de nous mètodes de modificació selectiva de proteïnes que funcionin de manera altament eficient en les condicions més suaus possibles de reacció. En el nostre grup hem treballat extensament en aquesta àrea de recerca, i un dels últims mètodes en els quals hem treballat es basa en l'aplicació de la reacció bioortogonal entre grups cetona i grups aminoxi, juntament amb la generació de tioèsters de proteïnes.

La modificació de proteïnes en l'extrem C-terminal presenta avantatges importants, ja que permet la modificació en una única posició sense afectar els residus interns i, a més, en tractar-se generalment d'un extrem flexible i no implicat en la funció, la seva modificació no sol afectar la funcionalitat de la proteïna. D'altra banda, la reacció entre grups cetona i grups aminoxi compleix tots els requisits per a ser considerada una reacció bioortogonal. Sobre la base d'això, vam pensar que la reacció de tioèsters de proteïnes amb un lligador o *linker* funcionalitzat amb dos grups oxiamino hauria de permetre la modificació selectiva de proteïnes de manera ràpida i senzilla, ja que, mentre que el primer grup oxiamino reaccionaria amb la proteïna, el segon permetria la seva modificació selectiva després de ser tractat amb sondes que continguin grups cetona. Per a investigar aquesta reacció en detall, vam generar un lligador bisoxiamino i el vam fer reaccionar amb un tioèster de proteïna obtingut gràcies al vector IMPACT (figura 4). La mescla de reacció va ser incubada durant 12 h en un bany de gel i, posteriorment, es va tractar amb un fluoròfor funcionalitzat amb una cetona durant 4 h a temperatura ambient. L'anàlisi per electroforesi en gel i per espectrometria de masses de la proteïna resultant va confirmar que la lligació oxiamina permet el marcatge de proteïnes de manera ràpida i eficient en condicions molt suaus de reacció [7].

Doble marcatge de proteïnes en una reacció one-pot

Les proteïnes marcades amb dos fluoròfors diferents són eines molt útils per a estudiar els seus nivells de plegament o les interaccions amb altres proteïnes. Malauradament, però, la generació per mètodes químics d'aquestes proteïnes doblement marcades és molt complexa. Alternativament es poden utilit-

zar mètodes genètics, com la fusió de proteïnes fluorescents (GFP, YFP, etc.), però, en aquest cas, es produeix un augment molt gran de la mida de la proteïna, la qual cosa pot afectar els resultats obtinguts. Per tant, ens vam plantejar utilitzar el mètode de la lligació de tipus oxiamina en l'extrem C-terminal combinat amb la lligació química nativa en l'extrem N-terminal com a nova estratègia per a l'obtenció de proteïnes doblement marcades. Breument, si partim d'una proteïna que contingui un tioèster C-terminal i una cisteïna en l'extrem N-terminal com a nova estratègia per a l'obtenció de proteïnes doblement marcades. Breument, si partim d'una proteïna que contingui un tioèster C-terminal i una cisteïna en l'extrem N-terminal i la tractem seqüencialment amb un lligador bisoxiamino i un fluoròfor funcionalitzat amb grup cetona (per a la reacció oxiamino) i amb un grup tioèster modificat (per a la NCL), l'aproximació ens hauria de permetre obtenir proteïnes doblement marcades. Per estudiar la hipòtesi, vam generar una proteïna amb un tioèster C-terminal i vam introduir una seqüència a l'extrem N-terminal que, en ser tractada i reconeguda per una cisteïna proteasa del virus del gravat del tabac (*tobacco etch virus*, TEV), genera una proteïna amb una cisteïna N-terminal. La proteïna resultant va ser tractada, primer, amb el lligador bisoxiamina i, després, amb una fluoresceïna funcionalitzada amb un grup cetona, seguida d'una cumarina derivatitzada amb un grup tioèster. Per tal d'accelerar ambdues reaccions, es va afegir àcid mercaptofenil acètic i anilina com a catalitzadors de la lligació química de proteïnes i la lligació de tipus oxiamina, respectivament. En aquestes condicions, la doble modificació de la proteïna es va produir de manera selectiva i ràpida en condicions molt suaus de reacció. No només això, sinó que les dues modificacions es van poder realitzar de manera simultània en una reacció de tipus *one-pot*. Les proteïnes doblement marcades resultants són eines molt útils per a la caracterització de la seva estructura, el seu plegament i les interaccions amb altres proteïnes, tal com es pot veure en la figura 4, on, mitjançant estudis de tipus FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), es pot detectar el correcte plegament de la proteïna i la posterior pèrdua de senyal de tipus FRET, en tractar la proteïna amb la proteasa inespecífica subtilisina que causa la seva digestió [8].

Preparació de bioxips de proteïnes a través de la seva immobilització a partir de lisats cel·lulars

A més a més, aquest mètode de modificació selectiva pot ser també emprat per a la immobilització de biomolècules en superfícies i poder generar bioxips de proteïnes. Els bioxips o *microarrays* de proteïnes són de gran interès en les ciències de la vida, ja que requereixen volums molt petits i permeten el

processament d'una gran quantitat de mostres en poc temps. A més, creen plataformes que són molt útils tant per al desenvolupament de mètodes de diagnòstic com en l'àmbit de l'estudi d'interaccions amb lligands o altres proteïnes [9, 10].

L'estratègia per a la generació de bioxips de proteïnes utilitzant la lligació oxiamina comença amb el tractament de superfícies, prèviament activades amb grups àcids activats com a *N*-hidroxisuccinimides, amb un lligador que conté una cetona convenientment protegida. Posteriorment, es bloquegen els àcids activats de la superfície que no han reaccionat mitjançant el tractament amb una solució d'etanolamina. Un cop desprotegit el grup cetona, una solució de la proteïna modificada amb el lligador bisoxiamina es disposa sobre la superfície prèviament tractada i s'incuba a temperatura ambient durant 4 h. Passat aquest temps, les proteïnes que no han reaccionat amb la superfície s'eliminen mitjançant un rentat amb solució tampó i les proteïnes immobilitzades poden ser quantificades a partir de la intensitat de fluorescència (si s'utilitzen proteïnes prèviament marcades), o bé emprades per al seu reconeixement amb anticossos o per a l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna. A més, el tractament de les superfícies modificades amb lisats cel·lulars que contenen la proteïna i han estat prèviament tractats amb tiols i el lligador corresponent permet la immobilització de les proteïnes directament dels lisats cel·lulars sense la necessitat d'un pas previ de purificació. La gran eficiència del mètode descrit, juntament amb els avenços recents en la generació de tioèsters de proteïna, dona validesa a aquesta aproximació com a mètode d'aplicabilitat general per a la fabricació de bioxips de proteïnes [11].

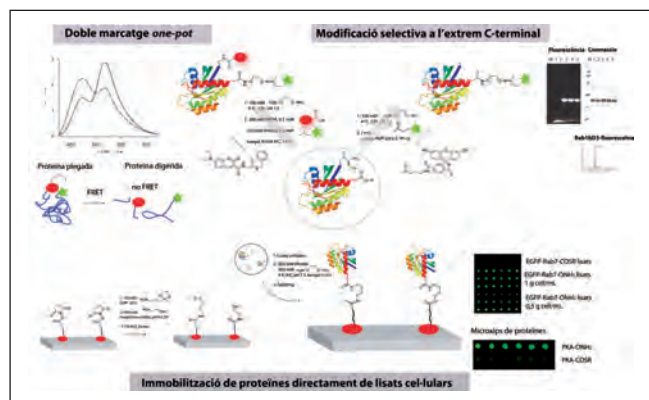


FIGURA 4. Aplicació de la lligació tipus oxiamina per a la modificació selectiva de proteïnes en l'extrem C-terminal, per al doble marcatge simultani en els extrems N-terminal i C-terminal i per a la immobilització de proteïnes en superfícies directament de lisats cel·lulars sense la necessitat d'un pas previ de purificació.

Semisíntesi de proteïnes modificades posttraduccionalment

La generació de tioèsters de proteïnes en l'extrem C-terminal no només és molt útil per a la modificació selectiva de proteïnes per tal d'introduir-hi sondes fluorescents que facilitin el seu estudi o cadenes de polietilenglicol que augmentin la seva estabilitat, sinó també per a l'obtenció de proteïnes semisintètiques.

Nombroses proteïnes requereixen una associació temporal amb la membrana per tal d'exercir la seva funció i interaccionar amb altres proteïnes també localitzades a la membrana. Aquesta associació amb la membrana s'aconsegueix mitjançant la hidrofobicitat que els confereixen lípids que s'hi uneixen posttraduccionalment, o sigui, mitjançant reaccions químiques que tenen lloc dins la cèl·lula i que són posteriors a la biosíntesi de proteïnes, també coneguda com a *traducció*. Els processos de lipidacions de proteïnes que trobem amb més freqüència en les cèl·lules són la incorporació de grups glicosilfosfatidilinositol, la miristoilació de residus a l'extrem N-terminal, l'acilació de residus de cisteïna amb àcids palmítics o la prenilació de cisteïnes C-terminals (figura 5).

Un exemple rellevant de proteïnes lipidades són els membres de la superfamília Ras de GTPases, com les isoformes N-Ras, H-Ras i K-Ras, importants oncogens que es troben mutats en aproximadament el 30 % de tots els càncers. Les tres isoformes comparteixen un domini catalític quasi idèntic i un domini hipervariable (HVR) format per uns vint-i-cinc aminoàcids i situat a l'extrem C-terminal. Aquest domini HVR conté una elevada variabilitat i és el responsable de l'associació amb la membrana. Les tres isoformes presenten una cisteïna C-terminal carboximetilada i lipidada amb un grup farnesil, que és indispensable però no suficient per a assegurar una unió esta-

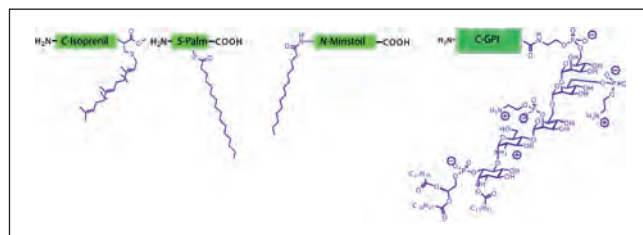


FIGURA 5. Modificacions lipídiques de proteïnes que es troben més freqüentment en les cèl·lules.

ble amb la membrana. Així, doncs, en el cas de N-Ras i H-Ras, l'associació estable amb la membrana s'aconsegueix mitjançant l'acilació addicional d'un o dos residus de cisteïna amb àcid palmític i, en el cas de K-Ras, el segon motiu de localització amb la membrana és una seqüència polibàsica formada per vuit lisines que interacciona amb els fosfolípids àcids (fosfatidilserina, fosfatidilinositol) que es troben, preferentment, a la cara interna de la membrana plasmàtica, la més àcida de totes les membranes cel·lulars.

Tot i que la farnesilació i la metilació de K-Ras4B són indispensables per a una correcta localització i funció d'aquesta proteïna, la majoria dels estudis realitzats fins ara utilitzaven només la part soluble de la proteïna a causa de la gran dificultat per a obtenir proteïnes completament modificades (lipidades i metilades) per mètodes de biologia molecular. Per aquest motiu ens vam plantejar emprar una aproximació de biologia química per a l'obtenció de l'oncogen K-Ras4B que contingués totes les seves modificacions posttraduccionals. Bàsicament, la idea era expressar una proteïna truncada en forma de tioèster que correspongués a cent setanta-quatre dels cent vuitanta-cinc aminoàcids que conté K-Ras4B i sintetitzar per mètodes de fase sòlida el pèptid C-terminal que contingués totes les modificacions desitjades (figura 6).

Per al disseny de la síntesi del pèptid, calia tenir en compte una sèrie de requisits limitants, com ara la gran susceptibilitat del farnesil en medi àcid i la necessitat d'obtenir el pèptid com a èster metílic en l'extrem C-terminal. Finalment, vam escollir la resina clorotritil, sensible a baixes concentracions d'àcid, i es va ancorar el segon aminoàcid a la resina, una lisina convenientment protegida per la seva cadena lateral. Un cop desprotegit selectivament l'èster al·lílic, es va fer reaccionar l'àcid resultant amb la cisteïna farnesilada i carboximetilada. A partir d'aquí, l'elongació de la cadena peptídica en direcció N-terminal es va fer per mètodes convencionals de

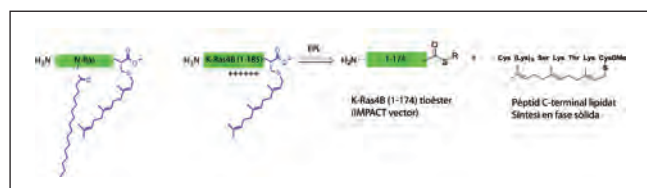


FIGURA 6. L'associació de N-Ras a la membrana es produeix per l'acció del grup farnesil i palmitoïl, mentre que la de K-Ras és deguda al grup farnesil i a la seqüència polibàsica que es troba a l'extrem C-terminal. Disseny retrosintètic de K-Ras4B mitjançant EPL d'un K-Ras tioèster corresponent als aminoàcids 1-174 i un pèptid lipídat (175-185) sintetitzat en fase sòlida.

síntesi de pèptids (desprotecció del grup Fmoc per tractament amb piperidina en DMF i acoblament dels aminoàcids prèviament activats amb HCTU en presència de diisopropilietilamina, DIPEA). Es va escollir el grup al·lilooxycarbonil (Alloc) com a grup protector per a les lisines, ja que permet la seva desprotecció ortogonal catalitzada per pal·ladi (0), i el grup tritil com a protector per a la serina i la treonina. Es va afegir una cisteïna addicional a l'extrem N-terminal per tal de poder dur a terme la lligació química amb el tioèster de la proteïna. Un cop sintetitzat el pèptid i desprotegits els grups Alloc, el tractament de la resina amb una solució de l'1 % d'àcid trifluoroacètic en diclorometà va permetre l'alliberament del pèptid del suport sòlid i la desprotecció concomitant dels altres grups protectors. Aquesta estratègia va permetre obtenir el pèptid en un 15 % de rendiment global després de la seva purificació per HPLC preparatiu (figura 7).

Per a preparar el tioèster de la proteïna, es va clonar el gen que codifica per la versió truncada de K-Ras4B en un vector de tipus IMPACT. El plasmidi resultant va ser transformat en cèl·lules d'*Escherichia coli* BL21 (DE3), i la proteïna recombinant de fusió K-Ras-inteïna-CBD va ser purificada mitjançant una columna cromatogràfica d'afinitat per quitina. Finalment, el tioèster desitjat va ser alliberat de la columna per tiòlisi mitjançant tractament amb MesNa per a proporcionar el tioèster de la proteïna (K-Ras 1-174MesNa), que va ser purificat per cromatografia d'exclusió per grandària i caracteritzat per ESI-MS. Finalment, es va dur a terme la lligació química incubant durant 4 h el pèptid sintetitzat i el tioèster de la proteïna en presència del reductor *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) per tal de reduir simultàniament el grup protector de la

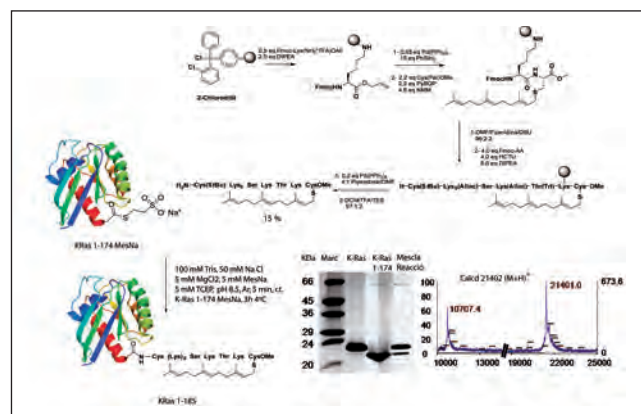


FIGURA 7. Síntesi del pèptid C-terminal de K-Ras4B lipídat i EPL amb el tioèster de la proteïna. Un cop aïllada i purificada, la proteïna semisintètica generada va ser analitzada i identificada per espectrometria de masses (MALDI-TOF).

cisteïna N-terminal (*tert*-butiltio) i permetre l'inici de la reacció de lligació química. Aquest procediment va permetre obtenir la proteïna semisintètica desitjada amb bon rendiment i en quantitat de mil·ligrams. Els diferents punts isoelèctrics entre la proteïna lligada K-Ras4B 1-185 ($pI = 8,2$) i el tioèster de la proteïna K-Ras 1-174MesNa ($pI = 5,3$) van facilitar la seva purificació per cromatografia d'intercanvi catiònic, de manera que es va obtenir la proteïna K-Ras4B 1-185 amb un 70 % de rendiment. La puresa i la identitat de la proteïna obtinguda es van analitzar per electroforesi en gel i MALDI-TOF.

Estudis d'interacció lípid/proteïna-proteïna

En l'entorn cel·lular, la proteïna K-Ras4B, un cop sintetitzada, es trasllada al reticle endoplasmàtic, on serà farnesilada i metilada, i llavors es mou fins a la membrana plasmàtica, on té lloc la seva activitat i implicació en cascades de senyalització cel·lular. Fins fa molt poc es desconeixia quins mètodes utilitzava K-Ras4B per a traslladar-se fins a la membrana plasmàtica: si era un transport que es produïa per difusió, mitjançant vesícules o mediat per la interacció amb altres proteïnes. S'havia suggerit que la subunitat δ de la fosfodiesterasa dels bastons de la retina (PDE δ), que es troba no només en els fotoreceptors, sinó àmpliament distribuïda per tots els teixits cel·lulars, podia tenir un paper molt important en aquest transport interaccionant amb proteïnes farnesilades i facilitant el seu moviment entre les diferents membranes cel·lulars. Malgrat tot, la funció exacta de PDE δ i l'especificitat d'aquesta interacció no havien pogut ser examinades en detall a causa de la falta d'eines que ho permetessin. La proteïna K-Ras4B, generada per nosaltres, que contenia tant el grup farnesil com el grup metil terminal, es va convertir, doncs, en una eina essencial per a estudiar l'especificitat de les interaccions PDE δ amb proteïnes farnesilades, així com les conseqüències d'aquesta unió.

Els estudis d'interacció es van realitzar mitjançant un assaig basat en anisotropia de fluorescència emprant diferents pèptids i proteïnes farnesilades i marcades fluorescentment. Breument, si s'aplica llum polaritzada a una molècula marcada, es genera fluorescència polaritzada. Si la molècula marcada es mou lliurement i aleatòria, el grau de polarització de fluorescència resultant serà baix. En canvi, si la molècula marcada (pèptid o proteïna) s'uneix a una altra de mida més

gran (proteïna), es produirà una disminució de la seva rotació que tindrà com a resultat un augment de la fluorescència polaritzada detectable. Aquest augment pot ser quantificat i emprat per a determinar la seva constant de dissociació (K_D) i l'afinitat del pèptid o la proteïna marcada per a la proteïna amb la qual interacciona. Per tal d'estudiar els requeriments de PDE δ per al reconeixement de pèptids i proteïnes farnesilades, vam emprar pèptids farnesilats (dipèptids o de major longitud) obtinguts per síntesi en fase sòlida i proteïnes farnesilades obtingudes mitjançant lligació de proteïnes. Els resultats d'aquests estudis van mostrar que una cisteïna farnesilada i metilada era el motiu mínim que necessitava PDE δ per a unir-se (K_D 616 nM, figura 8), tot i que l'afinitat de la proteïna pel pèptid augmentava significativament en utilitzar pèptids amb sis o vuit aminoàcids addicionals després de la cisteïna lipídica (K_D 227 nM), la qual cosa suggereix que la proteïna no només reconeixia el grup lipídic, sinó també els altres aminoàcids situats a l'extrem C-terminal. En canvi, l'afinitat de PDE δ per la proteïna semisintètica era comparable a la del pèptid ($K_D \approx 200$ nM), la qual cosa suggereix que, a part de l'extrem C-terminal, no hi havia interacció de PDE δ amb altres regions de K-Ras4B. Es van realitzar estudis semblants amb la proteïna semisintètica farnesilada Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), també obtinguda per mètodes de lligació de proteïnes expressades, i el seu corresponent pèptid farnesilat C-terminal. Rheb és un altre membre de la família de Ras GTPases que comparteix les mateixes modificacions posttraduccionals que K-Ras4B [12], però, en lloc d'una seqüència polibàsica, conté majoritàriament residus neutres en el seu extrem C-terminal. Els resultats obtinguts amb la proteïna i el pèptid derivat de Rheb van ser semblants als obtinguts amb K-Ras ($K_D \approx 200$ nM tant per al pèptid C-terminal com per a la proteïna), la qual cosa suggereix que, tot i que els aminoàcids propers a la cisteïna són necessaris per a obtenir una interacció d'afinitat elevada, no hi ha cap tipus d'especificitat dependent de la seqüència d'aminoàcids. Així, doncs, com a resultat d'aquests estudis, vam poder confirmar que PDE δ reconeix de manera general i inespecífica proteïnes farnesilades. Aquesta interacció es basa en el reconeixement del lípid i els aminoàcids situats en l'extrem C-terminal, sense que la resta de la proteïna tingui un paper rellevant en la interacció (figura 8).

Per tal de confirmar les bases d'aquesta interacció, vam intentar la cristal·lització del complex Rheb-PDE δ . Per aconseguir-ho, es va fer un cribratge de diferents condicions de cristal·lització, i les condicions adequades van ser emprades

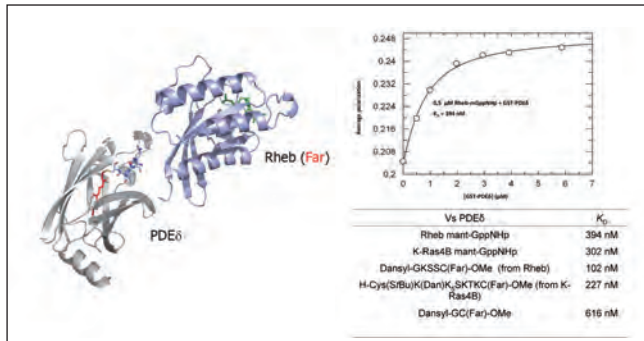


FIGURA 8. L'estudi d'anisotropia de fluorescència per a caracteritzar el reconeixement de PDEδ de pèptids i proteïnes farnesilades i l'estructura del complex Rheb-PDEδ determinada per cristal·lografia de raigs X permeten concloure que PDEδ reconeix de manera general proteïnes farnesilades interactuant amb el seu extrem C-terminal (lípid i residus adjacents) i que no té cap interacció amb la resta de la proteïna.

per a l'obtenció de cristalls del complex Rheb-PDEδ en quantitats més elevades. L'estudi dels cristalls obtinguts va permetre confirmar explícitament que el farnesil se situa en un solc d'unió o *binding pocket* format bàsicament per residus de tipus hidrofòbic i també interacciona amb els residus contigus a la cisteïna farnesilada, i que no hi ha cap mena d'interacció entre PDEδ i la resta de la proteïna Rheb, la qual cosa explica i confirma el paper de PDEδ com a solubilitzador i transportador universal de proteïnes farnesilades (figura 8) [13].

Inhibidors de la interacció lípid/proteïna-proteïna

Investigacions anteriors havien confirmat també a nivell cel·lular l'important paper de PDEδ en la correcta localització i funció de proteïnes farnesilades, en especial, dels importants membres de la superfamília Ras de GTPases, com ara Rheb o K-Ras [14]. Per exemple, el *knockdown* de PDEδ mitjançant mètodes genètics havia confirmat que si PDEδ no podia realitzar la seva funció com a solubilitzadora i transportadora d'aquestes proteïnes, la senyalització i la proliferació cel·lular produïda per aquests oncogenes quedaven afectades. El pas següent va ser, doncs, explorar aquesta interacció entre K-Ras4B i PDEδ com a nova diana per al tractament de càncers caracteritzats per una senyalització oncogènica de K-Ras, com és el cas de molts càncers de pàncrees, per als quals en aquest moment no existeix un tractament efectiu.

En primer lloc, vam dissenyar un assaig basat en la tecnologia Alphascreen (*amplified luminescent proximity homogeneous*

assay) que ens permetés trobar inhibidors d'aquesta interacció. Sobre la base de la informació prèviament obtinguda i tenint en compte que PDEδ només reconeix l'extrem C-terminal, vam establir un assaig basat en la interacció d'un decapeptid C-terminal de K-Ras i PDEδ. Un cop establert l'assaig, optimitzat i miniaturitzat a plaques de mil cinc-cents trenta-sis pous, es va passar a la identificació de molècules petites capaces d'inhibir la interacció entre PDEδ i el pèptid farnesilat mitjançant el cribratge d'una llibreria de compostos formada per dues-centes mil molècules, provinents de llibreries comercials o de derivats de productes naturals. Per tal de validar els resultats obtinguts, la inhibició dels compostos detectats en aquest cribratge va ser posteriorment confirmada per mètodes alternatius, com ara anisotropia de fluorescència o calorimetria isotèrmica per valoració (ITC). Un cop confirmada la inhibició, vam procedir a l'optimització de l'activitat dels compostos detectats mitjançant un procés basat en mètodes de biologia estructural (cristal·lització dels complexos inhibidor-PDEδ, disseny de nous inhibidors sobre la base de la informació obtinguda, síntesi, assaig i nova cristal·lització) i vam arribar a una generació d'inhibidors com Deltarasin (S)-4, que presenten una K_d nanomolar per la proteïna PDEδ (figura 9).

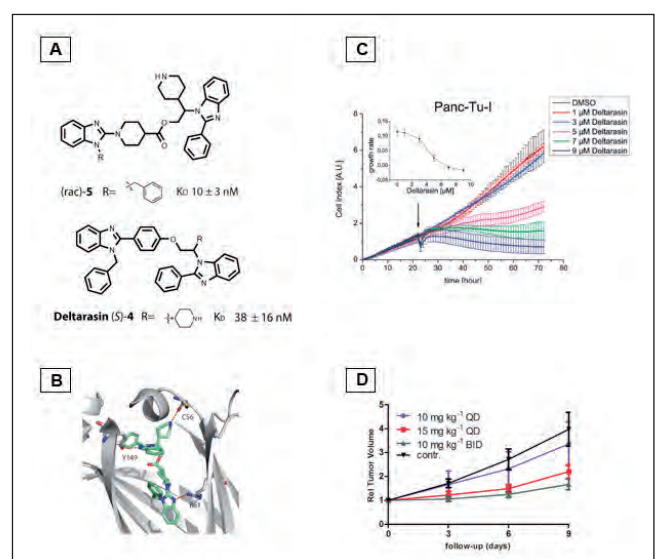


FIGURA 9. A) Estructura de l'inhibidor de la interacció Ras-PDEδ Deltarasin (S)-4 i del seu anàleg (rac)-5 obtinguts mitjançant síntesi química a partir de l'optimització dels inhibidors detectats en el cribratge d'una llibreria de dos-cents mil compostos. B) Estructura de raigs X de (rac)-5 dins el solc d'unió per al grup farnesil de la proteïna PDEδ. C) Deltarasin (S)-4 inhibeix el creixement de cèl·lules tumorals de pàncrees. D) Deltarasin (S)-4 administrat una vegada (QD) o dues vegades al dia (BD) inhibeix el creixement tumoral en xenografts de càncer de pàncrees en ratolins.

L'activitat de Deltarasin (S)-4 va poder ser també confirmada *in vivo*. Així, doncs, estudis en cèl·lules d'adenocarcinoma ductal de pàncrees van demostrar la capacitat de Deltarasin (S)-4 per a afectar la localització i la senyalització de Ras, així com el creixement de cèl·lules canceroses, mentre que estudis addicionals realitzats en xenografts de càncer de pàncrees van confirmar que el subministrament de l'inhibidor a ratolins provoca un estancament o disminució del creixement tumoral sense conseqüències negatives addicionals [15]. Esperem que aquest treball, que suposa un dels primers exemples d'inhibició de la senyalització Ras, serveixi de base per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques enfocades al tractament de càncers caracteritzats per una senyalització oncogènica de les proteïnes Ras, com és el cas d'alguns càncers colorectals o de pàncrees, ambdós amb elevats índexs de mortalitat.

Conclusions

La biologia química, entesa com l'ús d'eines químiques per a l'estudi de fenòmens biològics, és un instrument imprescindible per a investigar i entendre els processos biològics. Malgrat el gran avenç que la biologia química ha experimentat en l'última dècada, queda encara un llarg camí per endavant, sobretot en l'actual era postgenòmica, per a la caracterització de proteïnes de funció desconeguda i la identificació de noves dianes terapèutiques. En aquest context, és de gran interès el desenvolupament de nous mètodes de modificació selectiva de proteïnes mitjançant reaccions ràpides i eficients que permetin la introducció de marcatges (fluoròfors, d'afinitat, estabilitzadors, etc.) que facilitin el seu estudi per mitjans bioquímics, biofísics o cel·lulars. En aquest treball exposem l'ús de la lligació oxiamino com a mètode bioortogonal per a la modificació i la immobilització selectiva de proteïnes en el seu extrem C-terminal. Aquesta nova aproximació permet la modificació de proteïnes de manera ràpida i eficient i en condicions molt suaus de reacció. A més, aquesta tècnica pot ser aplicada per a la generació de bioxips de proteïnes mitjançant la immobilització de proteïnes directament de lisats cel·lulars i sense un pas previ de purificació.

Addicionalment, la síntesi química de proteïnes ha experimentat també un gran avenç permetent l'obtenció de proteïnes modificades posttraduccionalment amb gran puresa i en elevada quantitat, cosa que no era possible anteriorment

utilitzant únicament mètodes de biologia molecular. Així, l'aplicació d'estratègies de biologia química ens ha permès la síntesi dels oncogens K-Ras4B i Rheb completament modificats (amb la cisteïna C-terminal farnesilada i metilada essencial per a la seva correcta localització i funció cel·lular). Aquestes proteïnes sintetitzades han estat després indispensables per a la caracterització de PDEδ i la seva funció com a proteïna que reconeix de manera general grups farnesils i que té un paper crucial en la solubilització i el transport de proteïnes farnesilades entre les diferents membranes cel·lulars. La informació obtinguda ha pogut ser posteriorment emprada per a caracteritzar PDEδ com a nova diana d'interès terapèutic. L'establiment d'un assaig per a estudiar la unió entre PDEδ i proteïnes farnesilades i la seva aplicació per al cribatge d'una llibreria de compostos ha permès la identificació d'inhibidors de la interacció Ras-PDEδ que bloquegen el creixement de cèl·lules de càncer de pàncrees.

Aquesta aproximació pot suposar una nova estratègia terapèutica per al tractament de càncers caracteritzats per una senyalització oncogènica de les proteïnes Ras, associats generalment a elevats índexs de mortalitat. Aquests són només uns quants exemples del gran potencial que té l'aplicació d'eines de química orgànica a l'estudi de fenòmens biològics. En aquest cas, el treball conjunt de grups de químics i biòlegs ha permès no només determinar la rellevància de PDEδ en la senyalització cel·lular, sinó també traduir els resultats i les informacions obtinguts en noves estratègies terapèutiques.

La biologia química ha tingut una contribució essencial en l'estudi dels processos biològics realitzat en l'última dècada. La seva capacitat per a sintetitzar molècules petites que modulin gradualment i reversible la funció de les proteïnes o de preparar biomolècules modificades com a proteïnes o àcids nucleics que incorporin marcatges que facilitin el seu estudi li dona un avantatge important enfront dels mètodes genètics. Aquesta àrea de recerca, que ja compta amb comunitats científiques molt importants en països com Anglaterra, Alemanya i els Estats Units, està experimentant també un creixement significatiu entre nosaltres, tal com queda palès amb la recent creació del grup especialitzat en química biològica de la Real Sociedad Española de Química. Encara queden, però, molts reptes futurs per a aquesta àrea de recerca, com ara incloure el gran dinamisme i la complexitat de les vies de senyalització cel·lular, desenvolupar millors fluoròfors que s'adeqüin als nous mètodes de visualització d'alta resolució, integrar els

avenços en espectrometria de masses i proteòmica, així com molts d'altres. És per tots aquests motius que la química biològica, amb la seva capacitat per a idear els estudis biològics adequats i dissenyar i sintetitzar les molècules necessàries, serà de ben segur en els propers anys una eina indispensable per a l'estudi i la caracterització de nombrosos processos biològics.

Referències

- [1] DAWSON, P. E.; MUIR, T. W.; CLARKLEWIS, I.; KENT, S. B. H. «Synthesis of proteins by native chemical ligation». *Science*, núm. 266 (1994), p. 776-779.
- [2] MUIR, T. W. «Development and application of expressed protein ligation». *Synlett*, s. núm. (2001), p. 733-740.
- [3] SLETTEN, E. M.; BERTOZZI, C. R. «Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 48 (2009), p. 6974-6998.
- [4] ROSTOVTSSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. «A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 41 (2002), p. 2596-2599.
- [5] TORNOE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. «Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides». *J. Org. Chem.*, núm. 67 (2002), p. 3057-3064.
- [6] BASKIN, J. M.; PRESCHER, J. A.; LAUGHLIN, S. T.; AGARD, N. J.; CHANG, P. V.; MILLER, I. A.; LO, A.; CODELLI, J. A.; BERTOZZI, C. R. «Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 104 (2007), p. 16793-16797.
- [7] YI, L.; SUN, H. Y.; WU, Y. W.; TRIOLA, G.; WALDMANN, H.; GOODY, R. S. «A highly efficient strategy for modification of proteins at the C-terminus». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 49 (2010), p. 9417-9421.
- [8] YI, L.; SUN, H.; ITZEN, A.; TRIOLA, G.; WALDMANN, H.; GOODY, R. S.; WU, Y. W. «One-pot dual-labeling of a protein by two chemoselective reactions». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 50 (2011), p. 8287-8290.
- [9] CHEN, Y. X.; TRIOLA, G.; WALDMANN, H. «Bioorthogonal chemistry for site-specific labeling and surface immobilization of proteins». *Acc. Chem. Res.*, núm. 44 (2011), p. 762-773.
- [10] WEINRICH, D.; JONKHEIJM, P.; NIEMEYER, C. M.; WALDMANN, H. «Applications of protein biochips in biomedical and biotechnological research». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 48 (2009), p. 7744-7751.
- [11] YI, L.; CHEN, Y. X.; LIN, P. C.; SCHRODER, H.; NIEMEYER, C. M.; WU, Y. W.; GOODY, R. S.; TRIOLA, G.; WALDMANN, H. «Direct immobilization of oxyamine-modified proteins from cell lysates». *Chem. Commun.*, núm. 48 (2012), p. 10829-10831.
- [12] CHEN, Y. X.; KOCH, S.; UHLENBROCK, K.; WEISE, K.; DAS, D.; GREMER, L.; BRUNSVELD, L.; WITTINGHOFER, A.; WINTER, R.; TRIOLA, G.; WALDMANN, H. «Synthesis of the Rheb and K-Ras4B GTPases». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 49 (2010), p. 6090-6095.
- [13] ISMAIL, S. A.; CHEN, Y. X.; RUSINOVA, A.; CHANDRA, A.; BIERBAUM, M.; GREMER, L.; TRIOLA, G.; WALDMANN, H.; BASTIAENS, P. I. H.; WITTINGHOFER, A. «Arl2-GTP and Arl3-GTP regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo». *Nat. Chem. Biol.*, núm. 7 (2011), p. 942-949.
- [14] CHANDRA, A.; GRECCO, H. E.; PISUPATI, V.; PERERA, D.; CASSIDY, L.; SKOULIDIS, F.; ISMAIL, S. A.; HEDBERG, C.; HANZAL-BAYER, M.; VENKITARAMAN, A. R.; WITTINGHOFER, A.; BASTIAENS, P. I. H. «The GDI-like solubilizing factor PDE delta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins». *Nat. Cell. Biol.*, núm. 14 (2011), p. 148-158.
- [15] ZIMMERMANN, G.; PAPKE, B.; ISMAIL, S.; VARTAK, N.; CHANDRA, A.; HOFFMANN, M.; HAHN, S. A.; TRIOLA, G.; WITTINGHOFER, A.; BASTIAENS, P. I.; WALDMANN, H. «Small molecule inhibition of the KRAS-PDE delta interaction impairs oncogenic KRAS signalling». *Nature*, núm. 497 (2013), p. 638-642.



G. Triola

Gemma Triola és llicenciada en farmàcia i doctora per la Universitat de Barcelona. Va realitzar la tesi doctoral a l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC) sota la supervisió d'Amadeu Llebaria i Gemma Fabriàs. L'any 2005 va iniciar una estada postdoctoral al grup de Herbert Waldmann, a l'Institut Max-Planck de Fisiologia Molecular (Dortmund, Alemanya), on a partir del 2009 va establir el seu propi grup de recerca. Els seus interessos científics se centren en l'exploració de nous mètodes per a la modificació i la immobilització de proteïnes, en la caracterització d'interaccions lípid-proteïna i en el desenvolupament d'eines químiques per a l'estudi de l'autofàgia. Des de l'any 2012, és científic titular de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC, CSIC).