



Facultad de Química - Departamento de Química Orgánica
Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares

SENSORES LUMINISCENTES DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN CÁNCER

Elena Pazos Chantrero
Febrero 2012



Facultad de Química – Departamento de Química Orgánica
Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS)

SENSORES LUMINISCENTES DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN CÁNCER

Memoria que, para optar al grado de Doctora
por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta
Elena Pazos Chantrero
Santiago de Compostela, Noviembre de 2011

D. JOSÉ LUIS MASCAREÑAS CID, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA y D. M. EUGENIO VÁZQUEZ SENTÍS, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICAN:

Que la memoria adjunta titulada “*Sensores luminiscentes de proteínas implicadas en cáncer*”, que, para optar al grado de Doctora en Química, presenta D^a Elena Pazos Chantrero, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica y del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS).

Considerando que constituye trabajo de Tesis, se autoriza su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 10 de Noviembre de 2011.

Fdo. José Luís Mascareñas Cid

Fdo. M. Eugenio Vázquez Sentís

Agradecimientos

Tras todo el tiempo en el que esta tesis ha ido cogiendo forma y avanzando, debo mostrar mi gratitud a un montón de personas sin las que esta experiencia no hubiera sido la misma.

En primer lugar quisiera agradecer a los directores de esta tesis por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo que tanto he disfrutado.

Al Prof. José Luís Mascareñas, por la confianza depositada en mi, sus observaciones y consejos y por todo su apoyo y ánimo.

Al Prof. M. Eugenio Vázquez, por haberme enseñado desde que entré en el laboratorio. Tengo que agradecerle toda la confianza que ha tenido en mi y la ayuda, ánimo y amistad que me ha dado durante todo este tiempo y que han sido sin dudarle un gran apoyo para mi.

Al Prof. Anxo Vidal por proporcionarnos las muestras de ciclina A y todo el material “bio” que hemos necesitado para llevar a cabo esta tesis y sobre todo por acogerme en su laboratorio y dedicarme su tiempo para enseñarme a expresar proteínas. A la gente de su grupo por su ayuda y amabilidad. Al Prof. Enrique Pérez y a la Dr. Mar Orzáez por las muestras de ciclina A que nos proporcionaron y los ensayos que tan amablemente realizaron en su laboratorio. Al Dr. Hugo Gutiérrez por el tiempo dedicado a realizar los estudios de dinámica molecular.

A los Prof. Thorfinnur Gunnlaugsson y Scott K. Silverman por permitirme realizar mis estancias doctorales en sus grupos de investigación y haberme hecho sentir, tanto ellos como sus respectivos grupos, a gusto y como uno más.

A todos mis compañeros de laboratorio. A los de mi grupo por sus consejos y ayuda: Mateo, Suso, Olalla, Juan B. y especialmente a Cris, Ceci y Adrián, a los sintéticos: Fernando, Isaac, Helio, Lara, Marisel, Bea, Moisés, Paloma y a todos los demás: Alex, Miguel, Jordi, Diego, Iago, Manuel, Jorge, Arcadio, Rebeca, Gustavo, J. Manuel, Cris, Vero... A María y a Sergio por tener tantísima paciencia con nosotros y sobre todo a Lucia y a César por su amistad y cariño.

A los Prof. Javier Benavente y José Martínez Costas por permitirme usar su laboratorio siempre que lo he necesitado y a la gente de su grupo por su amabilidad.

También merecen mi agradecimiento aquellos que, aunque no entiendan de HPLCs y de laboratorio en general, han estado a mi lado, me han hecho reír y me han ayudado a olvidar los momentos más difíciles que ha habido durante todo este tiempo. A María, Sandra, Iria, Rosalía, Andrés, Alejandro y Cristina.

Finalmente, tengo que agradecer a mis padres, a mi hermana y a mi abuela que me hayan ayudado tanto siempre, que hayan hecho que me esfuerce en conseguir mis objetivos y que hayan estado siempre a mi lado, porque sin ellos todo esto no hubiera sido posible.

"Solving the problem is the exciting part,
not knowing the answer."

Paul Arden – *Whatever you think, think the opposite.*

A mi madre y a mi padre

Índice

Abreviaturas	v
Introducción	1
El destino de la célula: dividirse, no dividirse o morir	3
El ciclo celular y el cáncer.....	5
Conceptos generales	5
Elementos de señalización celular: quinasas.....	6
Consideraciones generales	6
Quinasas específicas de serina y treonina: proteína quinasa C y CDKs	7
Sensores de quinasas e inhibidores de CDK-ciclina	10
Sensores de quinasas.....	10
Inhibidores de CDK-ciclina.....	11
Factores de transcripción y expresión génica.....	14
Expresión génica.....	14
La transcripción génica y su regulación	15
Factores de transcripción y su interacción con el ADN.....	16
Características del ADN	16
Factores de transcripción	18
Factores de transcripción y cáncer	21
Complejo AP-1: Fos y Jun.....	22
Cremalleras de leucinas.....	24
Modulación externa de la actividad de factores de transcripción	26
Luminiscencia	30
Conceptos generales	30
Sensores fluorescentes.....	32
Sensores fluorescentes sensibles a la polaridad del medio	32
Complejos de lantánidos luminiscentes	35
Sensores luminiscentes basados en complejos de lantánidos.....	37
Objetivos	41
Resultados y discusión	47
Sensores de proteína quinasa C	49
Diseño de complejos peptídicos de Tb(III) como sensores de proteína quinasa C.....	51
Síntesis.....	54

Planteamiento sintético	54
Síntesis del ligando macrocíclico	55
Síntesis de los derivados peptídicos K1	55
Acoplamiento del ligando macrocíclico 2	57
Coordinación de Tb ³⁺	58
Síntesis del ligando macrocíclico modificado 3.....	59
Síntesis de los derivados peptídicos con el ligando macrocíclico modificado.....	60
Acoplamiento del ligando macrocíclico 3	60
Coordinación de Tb ³⁺	62
Ensayos de luminiscencia.....	64
Ensayos de luminiscencia para detectar la formación de los complejos metálicos	64
Cálculo del número de moléculas de agua coordinadas al metal.....	67
Conclusiones	71
Sensores de ciclina A basados en complejos de Tb(III)	73
Diseño de los sensores de ciclina A basados en complejos de Tb(III) ..	75
Síntesis del complejo peptídico C1 [Tb]	78
Ensayos de luminiscencia con ciclina A.....	82
Diseño de sensores de ciclina A basados en complejos macrocíclicos de Tb(III)	84
Síntesis de los péptidos modificados con el ligando macrocíclico	85
Síntesis del DOTA tris(t-Bu) éster	85
Síntesis de los péptidos	85
Ensayos de luminiscencia.....	91
Ensayos de interacción de los péptidos con ciclina A.....	91
Ensayos de selectividad	96
Conclusiones	98
Sensores solvatocrómicos de ciclina A	99
Diseño de sensores de ciclina A basados en fluoróforos solvatocrómicos	101
Síntesis de los sensores peptídicos	103
Planteamiento sintético	103
Síntesis del anhídrido de 4-DMAP	104
Síntesis de los derivados peptídicos	104
Acoplamiento del anhídrido 4-dimetilaminoftálico	105
Acoplamiento del cloruro de NBD	107

Ensayos con ciclina A	109
Estudios fluorescentes de las interacciones péptido-ciclina A.....	109
Estudios de dinámica molecular	116
Uso de las sondas como herramientas para la identificación de inhibidores de ciclina A	117
Conclusiones	119
Sensores de cremalleras de leucinas y del FT c-Jun	121
Diseño de sensores de cremalleras de leucinas	123
Síntesis de los péptidos E ₄ y K ₄	126
Síntesis de los péptidos derivados de K ₄	126
Síntesis de E ₄	129
Ensayos de interacción de los derivados de K ₄ con E ₄	131
Ensayos de luminiscencia	131
Ensayos de dicroísmo circular	134
Diseño de sensores del factor de transcripción c-Jun	136
Síntesis de los péptidos	137
Síntesis de los péptidos basados en c-Fos	137
Síntesis de c-Jun y c-Fos.....	139
Ensayos de interacción de los derivados con c-Jun.....	142
Ensayos de luminiscencia	142
Ensayos de dicroísmo circular	148
Conclusiones	150
Conclusiones.....	151
Parte experimental.....	155
Metodología de trabajo	157
Protocolo General de SPPS	160
Reactivos y disolventes utilizados	160
Preparación de la resina	161
Proceso sintético.....	161
Determinación de la concentración de las disoluciones de los péptidos y de ciclina A.....	163
Determinación de las constantes de disociación a partir de datos espectroscópicos	164
Reacciones.....	166

Hidrobromuro de 1,4,7-tris(tert-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (2)	166
1,4,7-tris(tert-butoxicarbonilmetil)-10-(3'-aminopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (3)	168
Ácido 1,4,7-tris(tert-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-10-acético (4)	170
Anhídrido 4-dimetilaminoftálico (7)	172
Síntesis de los péptidos K1D, ^P K1D, K1E y ^P K1E	174
Síntesis en fase sólida y acetilación	174
Eliminación del grupo alilo	175
Acoplamiento del ligando 2	176
Síntesis de los péptidos K2D, ^P K2D, K2E y ^P K2E	181
Acoplamiento del ligando 3	181
Síntesis de los péptidos C1 y C2	186
Protocolo de eliminación ortogonal del grupo alloc	189
Obtención de C3, C4, C5, ^{W9} K ₄ , ^{W17} K ₄ , ^{W9/17} K ₄ , Fos ^W , A-Fos ^W	191
Coordinación de Tb ³⁺ a los péptidos C3, C4, C5, ^{W9} K ₄ , ^{W17} K ₄ , ^{W9/17} K ₄ , Fos ^W y A-Fos ^W	193
Obtención de los péptidos C7a, C8a, C9a, C10a, C11a, C12a y C13a	202
Obtención de C7b, C8b, C9b y C10b	211
Síntesis de los péptidos no modificados I1, I2, I3, E ₄ , c-Fos y c-Jun	216
Anexos	223
Anexo 1: Síntesis de péptidos en fase sólida	225
Anexo 2: Espectroscopía de dicroísmo circular	230
Dicroísmo circular de péptidos y proteínas	231

Abreviaturas

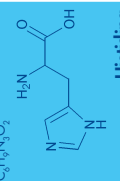
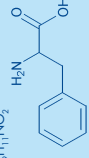
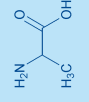
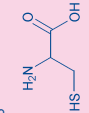
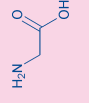
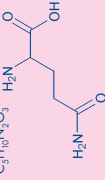
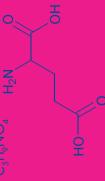
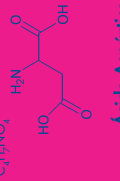
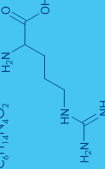
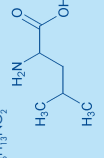
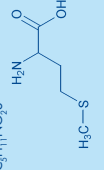
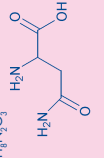
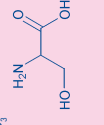
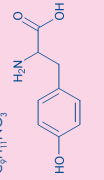
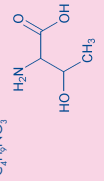
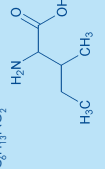
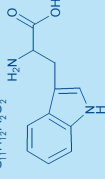
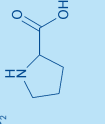
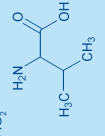
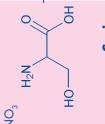
X	fracción molar
δ	desplazamiento químico
ϵ	coeficiente de extinción constante dieléctrica
λ	longitud de onda
μg	microgramo
μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrometro
ν	número de onda
τ	tiempo de vida de la luminiscencia
$^{\circ}\text{C}$	grado centígrado
Ac	acetil
Ac_2O	anhídrido acético
ADN	ácido desoxirribonucleico
all	alilo
alloc	aliloxicarbonil
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNpol	ARN polimerasa
ATP	adenosíntrifosfato
a.u.	unidades arbitrarias
Bn	bencil
Boc	tert-butoxicarbonil
BSA	seroalbúmina bovina
Bzl	benciloxicarbonil
CBG	surco de unión a ciclina
CBM	patrón de unión a ciclina
CD	dicroísmo circular
CDCl_3	cloroformo deuterado
CDK	quinasa dependiente de ciclina

CD ₃ OD	metanol deuterado
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CH ₃ CN	acetonitrilo
CKI	inhibidores de CDK
Cl-NBD	4-cloro-7-nitrobenzofurazano
cm	centímetro
c.p.s.	cuentas por segundo
d	doblete
Dap	ácido 2,3-diaminopropanoico
dd	doble doblete
DEDTC	dietilditiocarbamato
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
4-DMAP	4-dimetilaminoftalimida
DMF	dimetilformamida
dmol	decimol
DMSO	dimetilsulfóxido
D-N	dominante negativo
DOTA	ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DTPA	ácido dietilentriaminopentaacético
EDT	1,2-etanoditiol
eq	equivalentes
ESI	ionización por electrospray
Et ₃ N	triethylamina
Et ₂ O	dietiléter
EtOH	etanol
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
FT	factor de transcripción
GTP	guanosíntrifosfato
h	hora
HATU	hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

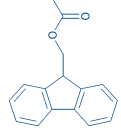
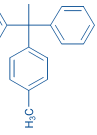
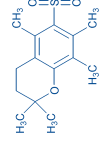

HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperacin-N'-2-etanosulfónico
HOAt	7-aza-1-hidroxi-benzotriazol
HOBt	1-hidroxi-benzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IC ₅₀	mitad de la concentración máxima inhibitoria
IgG	inmunoglobulina G
i-PrOH	isopropanol
J	constante de acoplamiento
K _D	constante de disociación
ℓ	longitud del paso óptico
M	molar
m	multiplete
mAU	miliunidades de absorbancia
MBP	proteína básica de la mielina
Me	metil
MeOH	metanol
mg	miligramo
MHz	megahertzio
min	minuto
mL	mililitro
mmol	milimol
mre	elipticidad molar por residuo
MS	espectrometría de masas
ms	milisegundo
m/z	relación masa carga
nM	nanomolar
nm	nanómetro
NMM	N-metilmorfolina

PAL	ácido 5-(4-(9-fluorenilmetoxicarbonil)aminometil)-3,5-dimetoxifenoxivalérico
Pd/C	paladio sobre carbón activo
PEG	polietilenglicol
Ph	fenil
PKC	proteína quinasa C
ppm	partes por millón
PS	poliestireno
PyAOP	hexafluorofosfato de fosfonio de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris (pirrolidino)
PyBOP	hexafluorofosfato de fosfonio de benzotriazol-1-iloxitris (pirrolidino)
RMN	resonancia magnética nuclear
r.p.m.	revoluciones por minuto
s	segundo
	singlete
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida
t-Bu	tert-butil
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TIS	triisopropilsilano
TMS	tetrametilsilano
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico
t _R	tiempo de retención
UV	ultravioleta

Tabla periódica de los aminoácidos

H 155.16 137.14 $C_9H_9N_3O_2$  His Histidina	F 165.19 147.18 $C_9H_9NO_2$  Phe Fenilalanina	A 89.09 71.08 $C_3H_7NO_2$  Ala Alanina	C 121.16 103.14 $C_3H_7NO_2S$  Cys Cisteína	G 75.07 57.05 $C_2H_5NO_2$  Gly Glicina	Q 146.15 128.13 $C_5H_9NO_3$  Gln Glutamina	E 147.13 129.11 $C_5H_9NO_3$  Glu Ácido Glutámico	D 133.10 115.09 $C_4H_7NO_4$  Asp Ácido Aspártico				
R 174.20 156.19 $C_6H_{14}N_4O_2$  Arg Arginina	L 131.17 113.16 $C_6H_{13}NO_2$  Leu Leucina	M 149.21 131.20 $C_5H_9NO_2S$  Met Metionina	N 132.12 114.10 $C_4H_7NO_2$  Asn Asparagina	S 105.09 87.08 $C_3H_7NO_2$  Ser Serina	Y 181.19 163.17 $C_9H_9NO_3$  Tyr Tirocina	T 119.12 101.10 $C_4H_7NO_3$  Thr Treonina	I 131.17 113.16 $C_6H_{13}NO_2$  Ile Isoleucina	W 204.23 186.21 $C_{11}H_{12}N_2O_2$  Trp Triptófano	P 115.13 97.12 $C_5H_9NO_2$  Pro Prolina	V 117.15 99.13 $C_5H_9NO_2$  Val Valina	Ser Código de 1 letra: S Código de 3 letras: Ser Masa molecular relativa: 105.09 $C_3H_7NO_2$ $M_r = H_2O$ Fórmula molecular:  Serina — Nombre

Grupos protectores comunes en síntesis Fmoc de péptidos

Fmoc 9-Fluorenilmetoxi-carbonil $M_r = 223.25$ 	Mtt 4-Metilnitro $M_r = 257.36$ 	Pnc 2,2,5,7,8-Pentametil-croman-6-sulfonil $M_r = 287.37$ 	t-Bu t-Butil $M_r = 57.12$ 
--	---	---	--

Introducción

El destino de la célula: dividirse, no dividirse o morir

Las células se generan a partir de células mediante la división de las que ya existen. Una célula se reproduce mediante una secuencia de eventos en los que duplica su contenido y a continuación se divide en dos. Este proceso se conoce como **ciclo celular** y es el mecanismo esencial por el cual todos los seres vivos crecen y se reproducen.¹

Las células no se dividen continuamente sino que pueden permanecer en estado de quiescencia, si no se dan las condiciones favorables para dividirse, o desaparecer mediante procesos de apoptosis cuando ya no son necesarias para el organismo. Las diferentes etapas del ciclo celular están reguladas y controladas por enzimas, proteínas y cofactores externos. En muchos casos, las sustancias que controlan de forma indirecta la progresión de una etapa a otra del ciclo son los **factores de transcripción**, que son proteínas responsables de inducir la iniciación de la transcripción de determinados genes. Esto los convierte en reguladores esenciales de la célula.

Es muy importante que la división y el crecimiento celular estén perfectamente regulados, ya que la falta de control en alguna etapa del ciclo puede generar una proliferación celular excesiva y provocar la aparición de enfermedades tan graves como el **cáncer**. La palabra cáncer se refiere a un conjunto de enfermedades que tienen como elemento común una proliferación celular descontrolada y la diseminación de células tumorales en el organismo, invadiendo y dañando diferentes tejidos y órganos. Después de las enfermedades cardíacas, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo.² En 2002 se diagnosticaron 11 millones de casos de cáncer³ y se prevé que en 2020 se alcancen los 17 millones de casos y en 2050 a los 27 millones.⁴

-
- 1 Alberts, B.; Jonhson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *The Cell Cycle and Programmed Cell death. Molecular Biology of the Cell*, 4 ed.; Garland Science: New York, 2001; pp 983-1026.
 - 2 *Breakaway: The global burden of cancer - challenges and opportunities*; Economist Intelligence Unit; The Economist: 2009.
 - 3 Parkin, M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. *CA Cancer J. Clin.* **2005**, 55, 74.
 - 4 Cavalli, F. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2006**, 3, 582.

Entender las bases moleculares de la desregulación del ciclo celular, identificar nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos anticáncer selectivos y eficientes⁵ y perfeccionar las técnicas de detección y diagnóstico de tumores son alguno de los retos más apasionantes de las investigaciones actuales en el campo de la biomedicina.⁶ La **Química Biológica**, como rama de la ciencia que pretende utilizar las herramientas y técnicas de la química para el estudio y entendimiento de los mecanismos biológicos, ofrece posibilidades únicas para realizar aportaciones relevantes en estos temas.⁷

En este trabajo de tesis nos hemos planteado el diseño y desarrollo de sensores luminiscentes de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y de factores de transcripción oncogénicos.

5 Fedorov, O.; Müller, S.; Knapp, S. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 166.

6 Weissleder, R.; Pittet, M. J. *Nature* **2008**, 452, 580.

7 Morrison, K. L.; Weiss, G. A. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 3.

El ciclo celular y el cáncer

Conceptos generales

El ciclo celular es el proceso por el cual una célula se transforma en dos. La división celular conlleva una serie de etapas llamadas comúnmente fases del ciclo celular. El ciclo comienza con el crecimiento de la célula (aumento de tamaño y número de estructuras celulares como ribosomas, membranas y orgánulos), a continuación tiene lugar la replicación de su ADN durante la fase S y finalmente tiene lugar la distribución de los componentes celulares y el ADN en núcleos individuales durante la mitosis (fase M) y la separación en dos células hijas (citoquinesis).

En la mayoría de las células, salvo en algunos casos como el de las células embrionarias tempranas, existen además dos fases intermedias, G_1 y G_2 . La fase G_1 incluye el periodo entre la fase M y la fase S; la fase G_2 abarca el periodo entre la fase S y la fase M. Desde la fase G_1 la célula puede pasar a un estado de quiescencia conocida como fase G_0 . En presencia de determinados elementos de señalización, la célula puede regresar de nuevo a la fase G_1 y continuar con el ciclo celular.⁸

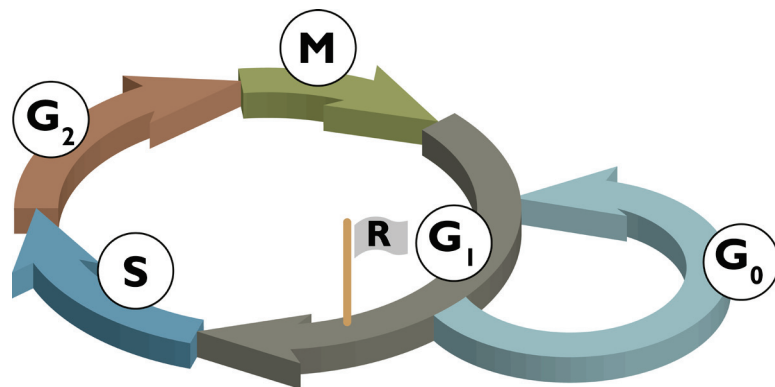


Figura 1. Esquema de las cuatro fases del ciclo celular. Las fases G_1 , S y G_2 forman la interfase. La división celular ocurre en la fase M.

Los sistemas de control del ciclo celular aseguran que las diferentes fases se han llevado a cabo por completo y en el orden correcto y que la entrada en la

8 Krauss, G. Regulation of the Cell Cycle. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 2 ed.; Wiley-VCH: Germany, 2001; pp 385-419.

siguiente fase solo se produce cuando la anterior ha finalizado.⁹ Muchos mecanismos de control están en funcionamiento permanentemente en cada ciclo celular y otros son inducidos exclusivamente cuando se detectan fallos en determinadas etapas del ciclo celular. Un punto de control importante para la regulación del ciclo celular es el denominado **punto de restricción (R)** que se encuentra en la fase G₁. A partir de este punto, las células que lo han pasado pueden progresar a través de la fase S independientemente de la presencia de señales extracelulares que estimulan el crecimiento celular y la división.¹

En contraste con las células normales, las células tumorales generalmente no responden a las señales reguladoras que inhiben el crecimiento. De hecho, una de las características del cáncer es que las células tumorales presentan mutaciones genéticas que alteran los puntos de control esenciales en la regulación del ciclo celular, como por ejemplo en el punto de restricción.¹⁰

Elementos de señalización celular: quinasas

Consideraciones generales

En los organismos celulares superiores, los mecanismos de señalización intercelular tienen la función de coordinar y regular la división celular asegurando que las células se dividen al mismo tiempo y de detener la división celular si es necesario.¹¹ Por lo tanto, la señalización intercelular influye casi en cada reacción fisiológica, asegurando que todas las células de un determinado tipo reciban y transformen una señal al mismo tiempo.

Estas señales externas afectan a los procesos intracelulares, que en muchos casos son regulados mediante procesos de fosforilación de proteínas catalizados por **quinasas**. En eucariotas, estas constituyen una familia extensa de proteínas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato en posición gamma del ATP o GTP a las cadenas laterales de residuos serina, treonina o tirosina de una

9 a) Morgan, D. O. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1997**, 13, 261. b) Murray, A. W. *Cell* **2004**, 116, 221.

10 Shi, W.; Dowdy, S. F. *Cell Cycle Controls in G₁ and G₀*. *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Lennarz, W. J., Lane, M. D., Eds.; Academic Press: London, 2004; vol. 1, pp 328–331.

11 Krauss, G. *Function and Structure of Signaling Pathways. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 2 ed.; Wiley-VCH: Germany, 2001; pp 119-147.

proteína, produciendo un efecto drástico en la actividad de sus sustratos como consecuencia de la fosforilación.¹²

Las quinasas controlan muchos procesos celulares, incluyendo metabolismo, transcripción, progresión en el ciclo celular, movimiento celular, apoptosis y diferenciación. La fosforilación de proteínas también juega un papel fundamental en la comunicación intercelular durante el desarrollo, en las respuestas fisiológicas y en homeostasis.¹³

Como consecuencia de su papel central en la regulación de los procesos celulares, un funcionamiento erróneo o descontrolado de estas enzimas puede influir de forma drástica en el desarrollo de enfermedades como el cáncer o la diabetes.^{12a}

Quinasas específicas de serina y treonina: proteína quinasa C y CDKs

Las quinasas se pueden dividir en subgrupos en función de su especificidad catalítica:¹⁴

Quinasas específicas de tirosina: crean un éster fosfato con el hidroxilo fenólico de los residuos de tirosina.

Quinasas específicas de serina y treonina: añaden un grupo fosfato al hidroxilo de los residuos de serina y treonina.

Otras quinasas menos comunes son las **quinasas específicas de histidina** que forman una fosforamida con el N en posición 1 o 3 de una histidina y que también fosforilan los residuos de arginina y lisina, o las **quinasas específicas de aspartato o glutamato** que crean un anhídrido mixto fosfato-carboxilato.

Hay mucha información disponible tanto de la estructura como de la función de quinasas específicas de Ser/Thr y de Tyr, en cambio los otros grupos no están completamente caracterizados. Las primeras quinasas que se

-
- 12 a) Sridhar, R.; Hanson-Painton, O.; Cooper, D. R. *Pharm. Res.* **2000**, 17, 1345.
b) Adams, J. A. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2271. c) Hanks, S. K.; Hunter, T. *FASEB J.* **1995**, 9, 576.
- 13 Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* **2002**, 298, 1912.
- 14 a) Blume-Jensen, P.; Hunter, T. *Nature* **2001**, 411, 355. b) Krauss, G. *Ser/Thr-specific Protein Kinases and Protein Phosphatases. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 2 ed.; Wiley-VCH: Germany, 2001; pp 247-285.

descubrieron fueron las quinasas específicas de Ser/Thr. Con el descubrimiento de las específicas de Tyr quedó claro que se trata de una clase de proteínas muy amplia con una función importante en los procesos de crecimiento y diferenciación.

Un ejemplo de quinasas específicas de Ser/Thr es la familia de la **proteína quinasa C (PKC)** que está involucrada en la regulación de multitud de procesos celulares como la proliferación y la diferenciación.

Al igual que otras familias de quinasas, las PKC presentan una heterogeneidad significativa. Al menos se han identificado doce subtipos diferentes de la proteína quinasa C con diferentes secuencias o mecanismos activación y regulación. La mayoría de las proteínas de esta familia requieren Ca^{2+} , fosfolípidos y diacilglicerol como cofactores para su activación.¹⁵

Una característica de la familia de proteína quinasa C es que se activa mediante la unión de agentes promotores de tumores como son los ésteres de forbol. Aunque no está claro cual es el mecanismo de acción de estos agentes, si se sabe que la activación desregulada de la proteína quinasa C puede desencadenar la fosforilación indebida de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular.

Unos de los sustratos específicos mejor caracterizados de la proteína quinasa C son las proteínas MARCKS (myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate), una familia de proteínas implicada a su vez en la regulación del ciclo celular.

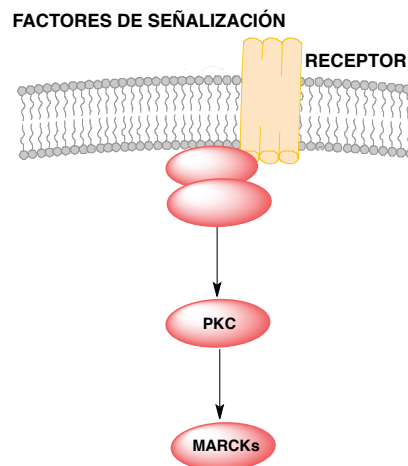


Figura 2. Esquema de una ruta de señalización en la que la familia de proteína quinasa C (PKC) modifica directamente la familia de proteínas MARCKs.

15 a) Dekker, L. V.; Parker P. J. Trends Biochem. Sci. **1994**, 19, 73. b) Newton, A. C. Curr. Op. Cell Biol. **1997**, 9, 161.

Otro ejemplo de quinasas específicas de Ser/Thr que están involucradas en el control del ciclo celular es la familia de **quinasas dependientes de ciclina (CDKs)**, cuya actividad depende de su asociación con unidades reguladoras específicas llamadas **ciclinas**. Estas proteínas constituyen una familia muy diversa en la que la homología de secuencia suele concentrarse en una región de unos cien residuos que es necesaria para la unión y activación de las CDK.^{9a}

La oscilación en la actividad de complejos de CDK-ciclina desencadena los distintos eventos en el ciclo celular. Por ejemplo, se sabe que durante la fase estacionaria G_0 la actividad CDK se reduce drásticamente por los inhibidores de CDK (CKIs), por la degradación de las ciclinas reguladoras necesarias para su actividad y por la reducción en la expresión de las mismas. Cuando las condiciones del medio son favorables para la reproducción celular aumentan las concentraciones de las CDKs implicadas en las fases G_1 y S, permitiendo el paso de G_0 a G_1 y S. Las S-CDKs inducen la síntesis de ADN a través de un mecanismo que asegura que la síntesis tiene lugar una única vez en cada ciclo.

Una vez completada la fase S, la activación de las M-CDKs conduce a los eventos de la mitosis temprana donde la célula se prepara para la segregación de su material genético y estructuras fundamentales. La degradación de las M-CDKs provoca la citoquinesis y el final de la fase M.

La actividad de los complejos CDK-ciclina está regulada por diferentes mecanismos, entre ellos, la fosforilación de la unidad de CDK catalítica, la unión de proteínas inhibitorias específicas (CKIs), la proteólisis de ciclinas y cambios en la transcripción de genes reguladores que codifican los complejos.

Un par de ejemplos de complejos CDK-ciclina importantes en la regulación del ciclo celular son CDK2-ciclina E y CDK2-ciclina A. Estos complejos han sido muy estudiados y se sabe por ejemplo que ciclina A, además de tener una zona de unión con CDK, presenta otra zona con un bolsillo hidrofóbico a la que se unen multitud de sustratos. Se sabe también que estos complejos están implicados en la regulación del paso de la fase G_1 a la fase S del ciclo que se produce por la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb).

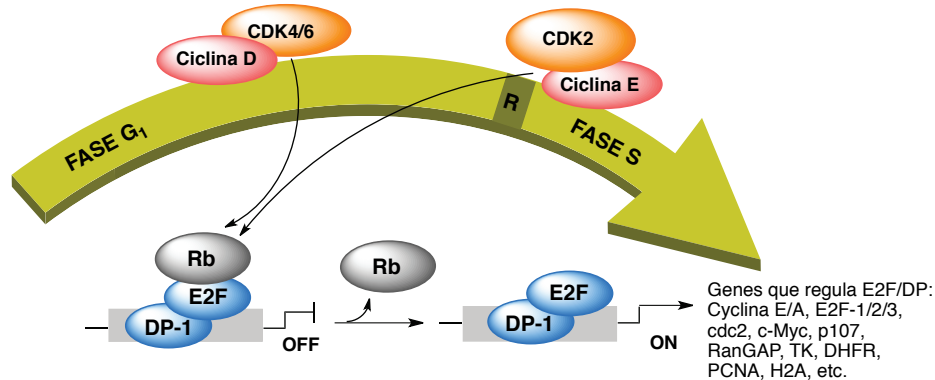


Figura 3. Esquema simplificado de la ruta de señalización del control del ciclo celular en el punto de control del paso de la fase G_1 a S, en el que se observa el papel que juegan las quinasas CDK4/6 y CDK2 al fosforilar a la proteína Rb.

Teniendo en cuenta el papel importante que juegan tanto la proteína quinasa C como los complejos CDK-ciclina en la regulación del ciclo celular, es obvio que hay un gran interés en desarrollar inhibidores de los complejos CDK-ciclina y, en general, sustancias que alteren el ciclo celular de forma controlable. También sería de enorme interés desarrollar sensores selectivos de estas proteínas como posibles marcadores de cáncer.

A continuación, se presentan algunos precedentes en estas líneas de trabajo.

Sensores de quinasas e inhibidores de CDK-ciclina

Sensores de quinasas

Como se ha visto, la fosforilación de proteínas reguladoras es la modificación más frecuentemente usada por la célula para modular su actividad. Las quinasas que catalizan esta transferencia de fosfato están implicadas prácticamente en cada aspecto del funcionamiento celular, de ahí la relevancia de desarrollar sensores para monitorizar su actividad. Los quimiosensores basados en péptidos que proporcionan cambios de fluorescencia después de la fosforilación son herramientas muy interesantes ya que permiten observar la actividad de las quinasas a tiempo real.

Por ejemplo, se han desarrollado sensores de diferentes miembros de la familia de la proteína quinasa C. Alguno de estos sensores se basa en la presencia del fluoróforo NBD que se caracteriza por presentar distintas propiedades fluorescentes dependiendo de las características fisicoquímicas de su entorno inmediato. La fosforilación del grupo hidroxilo en la posición

vecina provoca el cambio en las propiedades del fluoróforo, observándose aumentos en la señal de fluorescencia de 2.5 veces después de la fosforilación, lo que permite monitorizar la actividad de PKC en lisados celulares y en células vivas.^{16,17}

Otros sensores de la proteína quinasa C se basan en el aumento de la fluorescencia del aminoácido quelatante Sox que se produce en respuesta a la unión de un ion Mg^{2+} (figura 4). El diseño de estos sensores se basa en una secuencia de reconocimiento de quinasa variable que incluye el aminoácido que será fosforilado. El cambio en la intensidad de la emisión del fluoróforo depende de su distinta afinidad por el ión metálico según el estado de fosforilación del péptido.¹⁸

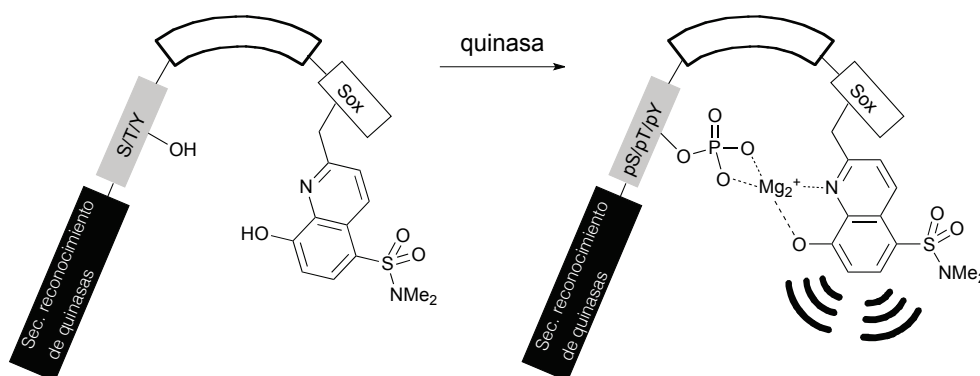


Figura 4. Diseño del sensor de quinasa. La fosforilación aumenta la constante de afinidad por el metal y la coordinación aumenta la señal de fluorescencia del aminoácido Sox.

Inhibidores de CDK-ciclina

Como se ha comentado antes, el ciclo celular está estrictamente coordinado por mecanismos moleculares, muchos de los cuales están regulados por complejos CDK-ciclina.^{9a,19} Por ello, estos complejos son dianas interesantes

-
- 16 a) Yeh, R.-H.; Yan, X.; Cammer, M.; Bresnick, A.; Lawrence, D. S. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 11527. b) Lawrence, D. S. *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 401.
- 17 a) Veldhuyzen, W. F.; Nguyen, Q.; McMaster, G.; Lawrence, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13358. b) Dai, Z.; Dulyaninova, N. G.; Kumar, S.; Bresnick, A. R.; Lawrence, D. S. *Chem. Biol.* **2007**, 14, 1254.
- 18 a) Shults, M. D.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14248. b) Lukovic, E.; González-Vera, J. A.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12821.
- 19 a) Yam, C. H.; Fung, T. K.; Poon, R. Y. C. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 1317. b) Hochegger, H.; Takeda, S.; Hunt, T. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 910.

para el desarrollo de agentes anticáncer.²⁰ Además de la inhibición directa del sitio catalítico de la unidad de CDK,²¹ existe un interés creciente en el diseño de moléculas que tengan como diana el **surco de unión a ciclina (CBG)** en el que se produce el reconocimiento de los sustratos que se van a fosforilar²² y de los inhibidores naturales de los complejos CDK-ciclina, como son p27, p21 o p53.

La estructura cristalina de la proteína p27, inhibidor natural de quinasas dependientes de ciclina, unida al complejo CDK2-ciclina A fue obtenida en 1996.²³ Esta estructura revela que p27 interactúa con ambas subunidades y se une a la subunidad de ciclina A en un surco hidrofóbico poco profundo a través de la secuencia conservada Leu-Phe-Gly. Esta unión sirve como punto de anclaje inicial y facilita las interacciones entre p27 y la subunidad de CDK, en las que p27 modifica la forma del centro catalítico de CDK y se introduce en él impidiendo así cualquier unión de ATP y consecuentemente inactivando su actividad como quinasa.

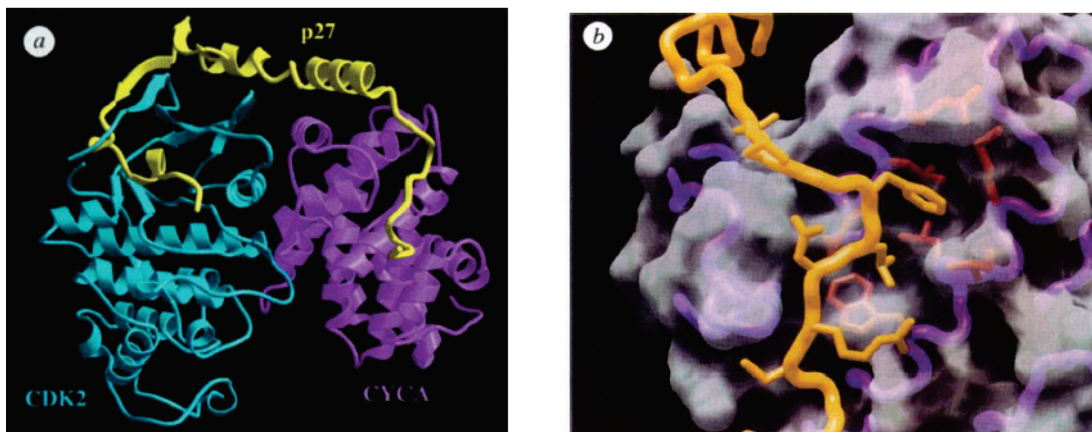


Figura 5. a) Estructura cristalina del complejo trimérico formado por CDK2-ciclina A-p27. b) Representación de la unión entre p27 y el surco hidrofóbico de la subunidad de ciclina A. Tomadas de la referencia 23.

-
- 20 a) Malumbres, M.; Carnero, A. *Prog. Cell Cycle Res.* **2003**, 5, 5. b) Dancey, J.; Sausville, E. A. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 296. c) Malumbres, M.; Barbacid, M. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, 1, 222.
- 21 Huwe, A.; Mazitschek, R.; Giannis, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2122.
- 22 a) Ball, K. L.; Lain, S.; Fåhraeus, R.; Smythe, C.; Lane, P. D. *Curr. Biol.* **1996**, 7, 71. b) Mendoza, N.; Fong, S.; Marsters, J.; Koeppen, H.; Schwall, R.; Wickramasinghe, D. *Cancer Res.* **2003**, 63, 1020.
- 23 Russo, A.; Jeffrey, D. J.; Patten, A. J.; Massagué, J.; Pavletich, N. P. *Nature* **1996**, 382, 325.

Teniendo en cuenta las secuencias de inhibidores naturales como p27 o p21 como patrón de unión a ciclina A, se han ensayado distintos péptidos como agentes capaces de complejarse con la subunidad de ciclina A.²⁴ Es especialmente interesante un octapéptido, derivado del extremo C-terminal del inhibidor p21, que sustituye un residuo de Ser original por uno de Ala. Este octapéptido, con secuencia HAKRRLIF, presenta mayor actividad biológica que el inhibidor natural p21.

En 2003 McInnes²⁵ describió que la condición necesaria para que se produzca un buen reconocimiento de péptidos en el surco hidrofóbico de la subunidad de ciclina A, similar al de proteínas naturales, es la presencia de una determinada secuencia conocida como **patrón de unión a ciclina (CBM)**. Esta secuencia consenso, definida a partir de las secuencias de distintas proteínas naturales como inhibidores del complejo CDK–ciclina, factores de transcripción, etc., se define como: **ZRXLYY'**, donde Z y X son residuos básicos e Y, Y' son residuos hidrofóbicos.

Ese mismo año, a través del estudio de rayos X de los complejos de distintos péptidos con ciclina A se descubrió una secuencia de unión alternativa con un patrón **RXLYY'**, observándose que el pentapéptido RRLIF presentaba una potencia de unión considerable.^{26,27}

-
- 24 Zheleva, D. I.; McInnes, C.; Gavine, A. L.; Zhelev, N. Z.; Fischer, P. M.; Lane, D. P. *J. Peptide Res.* **2002**, 60, 257.
- 25 McInnes, C.; Andrews, M. J. I.; Zheleva, D. I.; Lane, D. P.; Fischer, P. M. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2003**, 3, 57.
- 26 Kontopidis, G.; Andrews, M. J. I.; McInnes, C.; Cowan, A.; Powers, H. *Structure* **2003**, 11, 1537.
- 27 En los últimos años también se han desarrollado inhibidores del complejo CDK-ciclina que no unen ni al surco de reconocimiento de los sustratos ni al sitio catalítico de CDK, sino que interfieren en la formación del complejo CDK2-ciclina A. Canela, N.; Orzáez, M.; Fucho, R.; Mateo, F.; Gutierrez, R.; Pineda-Lucena, A.; Bachs, O.; Pérez-Payá, E. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 35942.

Factores de transcripción y expresión génica

Expresión génica

La expresión génica es el proceso mediante el cual la célula descodifica la información contenida en la secuencia de nucleótidos de un gen para generar una proteína. La expresión génica incluye el proceso de **transcripción**, en el que la secuencia de nucleótidos de una porción apropiada de la molécula de ADN se copia para dar lugar a una molécula de ARN, y el de **traducción**, mediante el cual el ARN se utiliza como molde para la síntesis de proteínas.

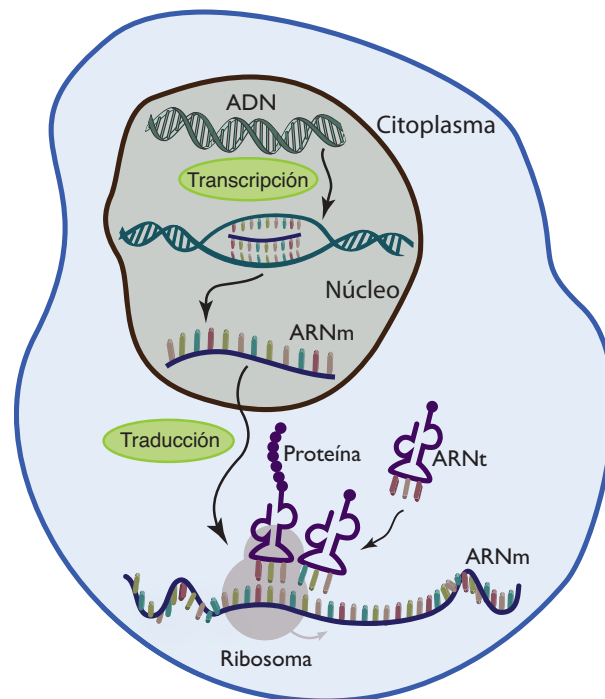


Figura 6. Representación del proceso de expresión génica.

En algunos casos, el producto final de la expresión génica es el propio ARN pero en la mayoría de los casos los genes determinan la síntesis de una proteína determinada. El ARN copiado de estos últimos se denomina **ARN mensajero** (ARNm). En células eucariotas, los transcritos de ARN (pre-ARNm) están sujetos a un procesamiento en el núcleo (modificaciones, corte y empalme) antes de dar lugar al ARNm maduro que será transportado al citosol para su

traducción.²⁸ El flujo de información genética en las células se produce, por tanto, desde el ADN al ARN y de este hacia las proteínas.²⁹

La expresión génica es un proceso perfectamente regulado en el espacio y en el tiempo, y sigue un patrón específico en cada célula, lo que determina su morfología y función. Este control puede producirse en cualquiera de sus etapas, pero en la mayor parte de los casos la regulación de la expresión génica se produce en la etapa de la transcripción.³⁰

La transcripción génica y su regulación

Como se ha señalado anteriormente, la transcripción génica es el proceso de transmisión de la información genética del ADN al ARN. Una de las cadenas sencillas del ADN actúa como hebra molde (hebra codificante) y determina el orden en que los monómeros de ribonucleósido trifosfato se incorporan para formar la cadena de ARN complementaria. Las bases de dichos monómeros se aparean con las bases de la hebra molde del ADN y se unen en una reacción de polimerización catalizada por el enzima ARN polimerasa.³¹

La regulación del proceso de transcripción génica se produce fundamentalmente durante la etapa de iniciación requiriendo para ello un complejo que contiene la ARN polimerasa y proteínas conocidas como **factores de transcripción (FT)**.³² Este complejo se une al ADN en la zona promotora, migra a un lugar de iniciación e incorpora los primeros nucleótidos.³³ La transcripción de los genes varía en función del conjunto de factores de

-
- 28 Mathews, C. K.; van Holde, K. E.; Ahern, K. G. Los genes eucariotas y su expresión. *Bioquímica*, 3 ed.; Pearson Educación: Madrid, 2002; pp 1205-1258.
- 29 Alberts, B.; Jonhson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. How cells read the genome: from DNA to protein. *Molecular Biology of the Cell*, 4 ed.; Garland Science: New York, 2001; pp 299-374.
- 30 Alberts, B.; Jonhson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Control of gene expression. *Molecular Biology of the Cell*, 4 ed.; Garland Science: New York, 2001; pp 375-466.
- 31 Mathews, C. K.; van Holde, K. E.; Ahern, K. G. Lectura de la información: transcripción. *Bioquímica*, 3 ed.; Pearson Educación: Madrid, 2002; pp 1105-1158.
- 32 Latchman, D. S. Families of DNA binding transcription factors. *Eukariotic Transcription Factors*, 4 ed.; Elsevier: London, 2004; pp 77-134.
- 33 Latchman, D. S. RNA polymerases and the basal transcriptional complex. *Eukariotic Transcription Factors*, 4 ed.; Elsevier: London, 2004; pp 55-76.

transcripción que se expresan y se activan en cada tipo de célula y en cada momento, lo que supone que la actividad de los factores de transcripción debe estar estrictamente regulada. De hecho, como ya se ha comentado, **muchos factores de transcripción regulan procesos de expresión de genes responsables de controlar diferentes etapas del ciclo celular**, por lo que si se encuentran continuamente activos pueden dar lugar a una proliferación celular incontrolada.

Dada la enorme importancia de los factores de transcripción, es fundamental comprender las bases moleculares de su interacción con otras proteínas y con el ADN. La creciente información sobre el genoma humano permite disponer cada vez de más datos sobre la relación entre errores transcripcionales y los distintos tipos de enfermedades, por lo que tendrá una gran relevancia diseñar estrategias para modificar procesos transcripcionales específicos de forma programable y selectiva o para detectar la presencia de factores de transcripción específicos en determinadas células.³⁴

Factores de transcripción y su interacción con el ADN

Características del ADN

El reconocimiento específico de secuencias de ADN por los factores de transcripción se basa en la complementariedad química y estructural de sus superficies moleculares. Por ello se resumirán a continuación las principales características estructurales del ADN en su forma B, que es la conformación más relevante en condiciones fisiológicas.

El ADN en su forma B se caracteriza por presentar una estructura helicoidal dextrógira en la que dos cadenas antiparalelas de desoxiribonucleótidos se encuentran enrolladas una sobre otra (figura 7). La estructura está estabilizada por enlaces de hidrógeno intermoleculares entre pares de bases complementarias y por interacciones hidrofóbicas que protegen las superficies apolares de las bases del entorno acuoso, mientras se exponen las partes polares y los fosfatos al disolvente.³⁵

34 Vázquez, M. E.; Caamaño, A. M.; Mascareñas, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, 32, 338.

35 Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, 171, 737.

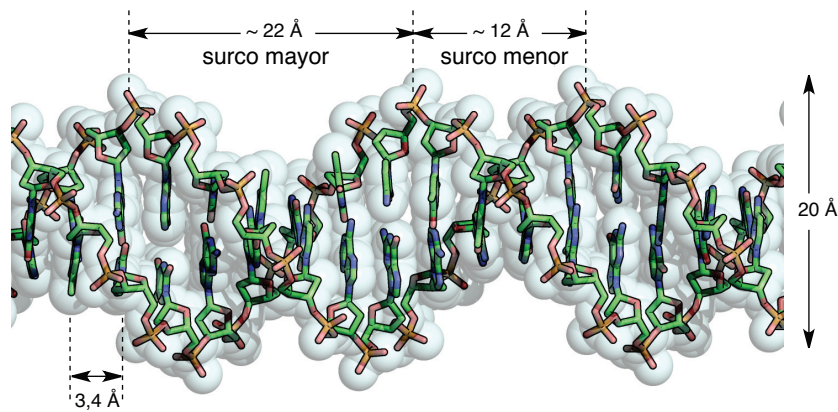


Figura 7. Representación de una conformación ideal del ADN en su forma B con sus principales características estructurales.³⁶

La asimetría de los nucleótidos genera dos surcos con distintas geometrías. El **surco mayor** es ancho y relativamente poco profundo y el **surco menor** es más estrecho y profundo.

En la mayoría de los casos, la unión de factores de transcripción al ADN no afecta al apareamiento de las bases del ADN puesto que el reconocimiento tiene lugar a través de interacciones entre los grupos funcionales expuestos de las bases y los de las cadenas laterales de los aminoácidos. Un análisis simple de los grupos funcionales muestra que el patrón dador-aceptor del surco mayor es más variable y contiene más información que en el surco menor.³⁷ De hecho, los patrones de los pares A/T y T/A en el surco menor son degenerados.

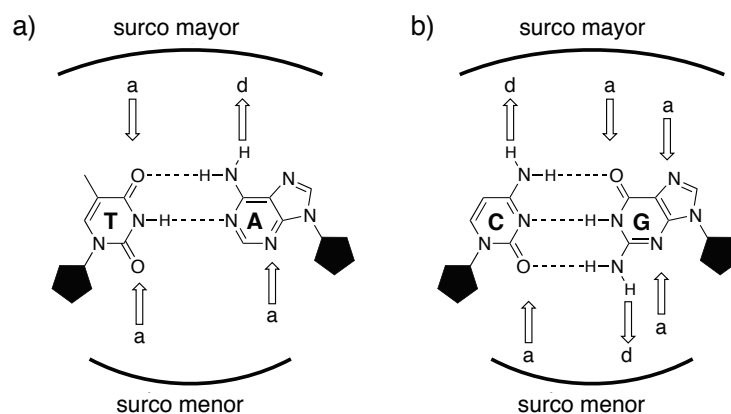


Figura 8. Bases del ADN indicando el patrón de enlaces de hidrógeno.

³⁶ Wing, R.; Drew, H.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E. *Nature* **1980**, 287, 755.

³⁷ Luscombe, N. M.; Laskowski, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H. *Nucl. Acids Res.* **2000**, 28, 235.

La mayoría de los factores de transcripción reconocen secuencias específicas del ADN. Esta especificidad está fundamentalmente determinada por las interacciones a través del surco mayor del ADN.

Factores de transcripción

A lo largo de los años se han resuelto, tanto por técnicas de RMN como de cristalografía de rayos X, las estructuras de numerosos complejos entre proteínas y ADN.³⁸ A partir de esas estructuras se han clasificado los factores de transcripción en unas pocas familias de acuerdo con el plegamiento de su dominio de unión al ADN (figura 9).

La familia de factores de transcripción bZip y bHLH.³⁹ La **región básica de cremalleras de leucinas (bZip)** es probablemente el más simple de los motivos de unión al ADN ya que consiste en dímeros de hélices α . En cada hélice hay dos zonas: la **cremallera de leucinas**, que se encuentra en el extremo C-terminal, se caracteriza por ser una zona rica en residuos de leucina y se encarga de la dimerización; y la **región básica**, una secuencia corta de unos 20 aminoácidos situada en el extremo N-terminal, que es la responsable del reconocimiento mediante los contactos directos con las bases del ADN y de los contactos secundarios con los fosfatos del esqueleto del ADN. Una característica importante de la unión al ADN de la familia bZip es que en disolución y en ausencia de su secuencia diana de ADN la región básica presenta poca estructura y solo adopta la conformación característica de hélice α después de su unión específica al ADN.

La **familia de la región básica de hélice-lazo-hélice (bHLH)** comparte con las proteínas bZip un modelo de unión al ADN similar y presenta, como única diferencia, la zona de dimerización que está formada por dos hélices separadas por una zona polipeptídica no helicoidal. Ambas familias agrupan una gran cantidad de proteínas que pueden formar homo y heterodímeros, lo que aumenta el número de secuencias de ADN que estas pueden reconocer.

38 Berman, H. M.; Westbrook, R. A.; Thornton, J. M. *Nucl. Acids Res.* **2001**, 29, 2860.

39 a) Hurst, H. C. *Prot. Profile* **1995**, 2, 105. b) Fujii, Y.; Shimizu, T.; Toda, T.; Yanagida, M.; Hakoshima, T. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 889.

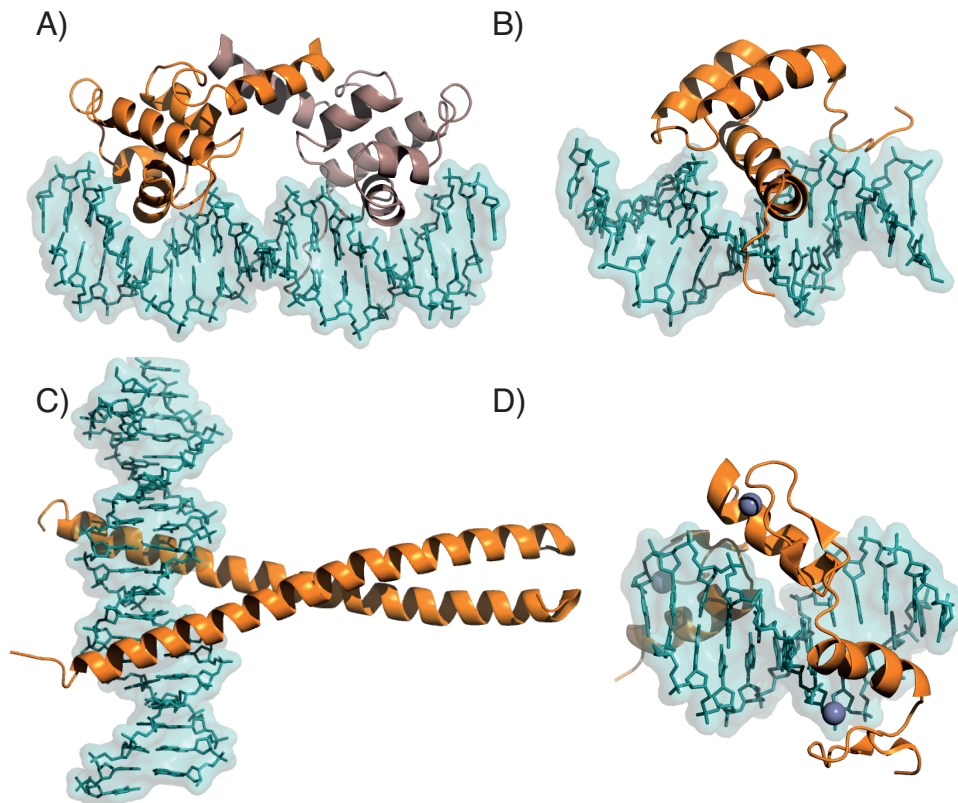


Figura 9. Estructuras representativas de los motivos de unión al ADN de los factores de transcripción: A) El dominio HTH del represor lambda (PDB 1LMB); B) El homeodominio Antennapedia de *Drosophila melanogaster* (PDB 1AHD); C) El dominio de unión bZip del factor de transcripción GCN4 (PDB 1YSA); D) Triada Cys₂-His₂ del factor de transcripción Zif268 (PDB 1AAY).

Familias Hélice-giro-hélice (HTH) y Homeodominio.⁴⁰ El motivo HTH es un elemento de reconocimiento habitual en organismos procariotas⁴¹ que incluye proteínas con estructuras muy diferentes pero que presentan un motivo común de dos hélices α unidas a través de un giro β . Una de las hélices, conocida como **hélice de reconocimiento**, se inserta en el surco mayor del ADN y realiza la mayoría de los contactos específicos con las bases y también interacciones secundarias con los azúcares y fosfatos del esqueleto. A pesar de la estructura común de HTH, los detalles estructurales de cada complejo con el ADN son diferentes ya que la hélice de reconocimiento puede tener diferentes longitudes o insertarse con distintas orientaciones en el surco mayor. Es importante destacar que las interacciones tienen lugar en forma de dímeros o incluso como

40 Gehring, W. J.; Qian, Y. Q.; Billeter, M.; Furukubo-Tokunaga, K.; Schier, A. F.; Resendez-Perez, D.; Affolter, M.; Otting, G.; Wüthrich, K. *Cell* **1994**, 78, 211.

41 Harrison, S. C. *Nature* **1991**, 353, 715.

especies de mayor orden, y que los monómeros de HTH son incapaces de unirse al ADN con alta afinidad.

El factor de transcripción Homeodominio se considera el equivalente a las proteínas HTH en eucariotas. Una diferencia entre las proteínas HTH de bacterias y los homeodominios eucariotas es que, en algunos casos, este último puede unirse al ADN diana como monómero puesto que, además del reconocimiento del surco mayor, puede establecer interacciones secundarias en posiciones que flanquean el surco menor por medio de brazos C- o N-terminal y que ayudan a aumentar la estabilidad del complejo. La unión al surco menor generalmente tiene lugar a través de colas peptídicas ricas en argininas⁴² como RQR en Src,⁴³ GRPR en la recombinasa Hin⁴⁴ o RKKR en los homeodominios POU.⁴⁵

La familia de los dedos de cinc. Esta familia constituye el grupo más grande de factores de transcripción⁴⁶ e incluye una variedad de estructuras que presentan secuencias basadas en residuos de Cys/His que estabilizan la estructura terciaria del factor de transcripción a través de la quelatación de cinc.⁴⁷ El dominio de unión al ADN de la clase más general de estas proteínas (Cys₂-His₂) tiene una longitud de unos 30 aminoácidos y contiene la secuencia C-X₄₋₅-C-X₁₂-H-X₃₋₅-H (donde C es cisteína, H es histidina y X es cualquier aminoácido). Después de la coordinación de Zn²⁺ a los dos residuos de Cys e His, el motivo se pliega en un dominio compacto ββα, consistente en una hélice α empaquetada frente a una horquilla β. El reconocimiento específico de secuencias de ADN tiene lugar por la interacción de la hélice α con el surco mayor del ADN. Es importante señalar que el proceso de reconocimiento requiere varias unidades de dedos de cinc unidos a través de secuencias peptídicas cortas.

-
- 42 Rohs, R.; West, S. M.; Sosinsky, A.; Liu, P.; Mann, R. S.; Honig, B. *Nature* **2009**, 461, 1248.
- 43 Joshi, R.; Passner, J. M.; Rohs, R.; Jain, R.; Sosinsky, A.; Crickmore, M. A.; Jacob, V.; Aggarwal, A. K.; Honing, B.; Mann, R. S. *Cell* **2007**, 131, 530.
- 44 Feng, J.-A.; Johnson, R. C.; Dickerson, R. E. *Science* **1994**, 263, 348.
- 45 Reményi, A.; Tomilin, A.; Pohl, E.; Lins, K.; Philippsen, A.; Reinbold, R.; Schöler, H. R.; Wilmanns, M. *Mol. Cell* **2001**, 8, 569.
- 46 Klug, A.; Schwabe, J. W. R. *FASEB J.* **1995**, 9, 597.
- 47 a) Iuchi, S. *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, 58, 625. b) Laity, J. H.; Lee, B. M.; Wright, P. E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 39. c) Wolfe, S. A.; Nekludova, L.; Pabo, C. O. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 183.

Factores de transcripción y cáncer

Cada vez se dispone de más información sobre las raíces genéticas del cáncer debido a la aparición de nuevas técnicas rápidas de secuenciación y cribado genético. De hecho, ya se han identificado más de 100 genes implicados en cáncer que se pueden agrupar en dos clases: **proto-oncogenes**, en los que una mutación produce una ganancia de función que deriva en el comportamiento canceroso de la célula y cuyas formas mutadas sobreactivas se denominan oncogenes, y **genes supresores de tumores**, en los que la mutación causa una pérdida de función clave en la detección y corrección de las lesiones que lleva en muchos casos a una hiperproliferación celular.⁴⁸

Se sabe que muchos de los productos proteicos de estos genes son factores de transcripción que controlan de forma directa o indirecta diferentes etapas del ciclo celular, existiendo así una **relación directa entre la expresión excesiva o errónea de determinados factores de transcripción y la generación y propagación de procesos cancerosos**.⁴⁹ Así, por ejemplo, es conocido que el factor de transcripción c-Jun⁵⁰ juega un papel clave en la progresión a través de la fase G₁ del ciclo celular. Esta progresión se produce por un mecanismo directo que implica el control transcripcional del gen que codifica a la ciclina D1. Otro ejemplo conocido es el del factor de transcripción c-Myc, que influye en la transición de la fase G₁ a la S estimulando la actividad de los complejos CDK2-ciclina E.⁵¹

48 a) Hartwell, L. H.; Kastan, M. B. *Science* **1994**, 266, 1821. b) Baserga, R. *Cell* **1994**, 79, 927.

49 a) Darnell, J. E. Jr. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 740. b) Brivanlou A. H. and Darnell, J. E. Jr. *Science* **2002**, 295, 813. c) Pandolfi, P. P. *Oncogene* **2001**, 20, 3116.

50 a) Wisdom, R.; Johnson, R. S.; Moore, C. *EMBO J.* **1999**, 18, 188. b) Bakiri, L.; Lallemand, D.; Bossy-Wetzels, E.; Yaniv, M. *EMBO J.* **2000**, 19, 2056.

51 Obaya, A. J.; Mateyak, M. K.; Sedivy, J. M. *Oncogene* **1999**, 18, 2934.

Complejo AP-1: Fos y Jun

La familia de proteínas Jun forma junto con la familia de proteínas Fos el complejo proteico AP-1,⁵² cuya secuencia de reconocimiento del ADN se encuentra en una gran variedad de regiones promotoras de genes que controlan la división celular.⁵³ Fos y Jun participan en la regulación de numerosos procesos celulares entre los que se incluyen la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y oncogénesis. Los miembros de estas familias, como c-Jun o c-Fos, aparecen expresados en numerosos tipos de células y tejidos tumorales.⁵⁴ Se ha demostrado además que la generación y propagación de muchos tipos de cáncer está relacionada con una desregulación en los niveles de expresión de Jun.⁵⁵

Tanto Fos como Jun pertenecen al grupo de factores de transcripción que usan el motivo bZip para interactuar con el ADN, formando dímeros que se unen a la secuencia consenso TGA(C/G)TCA.⁵³ La proteína Jun puede formar homodímeros y, preferentemente, heterodímeros con Fos; mientras la cremallera de leucinas de Fos forma homodímeros relativamente inestables, lo que hace que sea más favorable la formación del heterodímero con Jun.⁵⁶

Las familias de proteínas Fos y Jun son, además, funcionalmente muy versátiles debido a que a menudo actúan en combinación con otros factores de transcripción, dando lugar a complejos con elevada especificidad. Pueden interactuar con otras proteínas bZip (como ATF, C/EBP, Maf...). Asimismo, pueden interactuar con proteínas de otras familias estructurales que reconocen sitios de unión del ADN adyacentes al sitio AP-1, como por ejemplo factores de transcripción de las familias de NFAT, Ets, Smad y bHLH.^{54,57} Los complejos multiproteicos resultantes son más estables y su especificidad puede extenderse a elementos reguladores a los que no se unen las proteínas individuales.

52 Curran, T.; Franza B. R. Jr. *Cell* **1988**, 55, 395.

53 Angel, P. Karin, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1072, 129.

54 Chinenov, Y.; Kerppola, T. K. *Oncogene* **2001**, 20, 2438.

55 a) Vanhara, P.; Smarda, J. J. *Appl. Biomed.* **2006**, 4, 163. b) van Dam, H.; Castellazzi, M. *Oncogene* **2001**, 20, 2453. c) Vogt, P. K. *Oncogene* **2001**, 20, 2365.

56 a) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Stafford, W.F. III; Kim, P. S. *Science* **1989**, 245, 646. b) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. *Cell* **1992**, 68, 699.

57 Chen, L.; Glover, J. N. M.; Hogan, P. G.; Rao, A.; Harrison, S. C. *Nature* **1998**, 392, 42.

La estructura resuelta por difracción de rayos X del heterodímero formado por los dominios de reconocimiento de c-Fos y c-Jun unidas al ADN muestra que ambas subunidades forman una hélice α continua (figura 10). Siguiendo el motivo clásico de la familia bZip, la región de la cremallera de leucinas (C-terminal) forma un *coiled-coil* asimétrico mientras que la región básica (N-terminal) establece contactos específicos con el surco mayor del ADN. La comparación de dos complejos proteína-ADN diferentes, observados en el cristal, muestra que el *coiled-coil* está unido a las regiones básicas de una manera flexible y que el heterodímero Fos-Jun reconoce el elemento de unión asimétrico 5'-TGAGTCA-3' en distintas orientaciones.

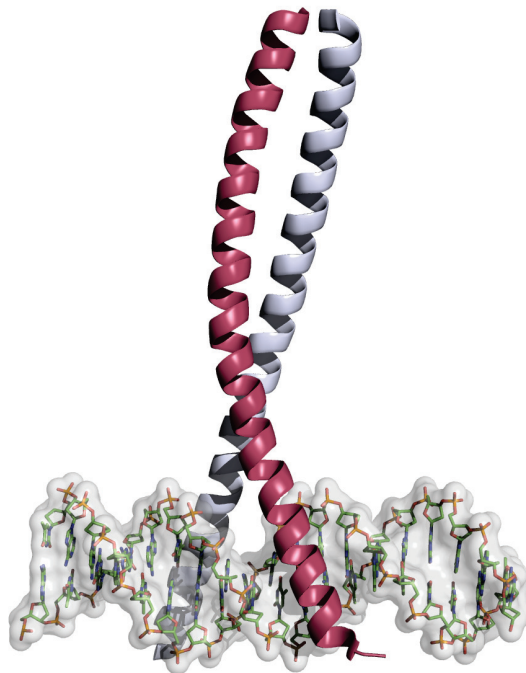


Figura 10. Estructura de rayos X del complejo de c-Fos (azul) y c-Jun (granate) y el dominio de unión AP-1 (5'-TGAGTCA-3').

La estructura muestra también que existe una gran cantidad de interacciones electrostáticas favorables entre las subunidades de cremalleras de leucinas, que son consistentes con la formación preferente del heterodímero frente a los posibles homodímeros.⁵⁸

58 Glover, J. N. M.; Harrison, S. C. *Nature* **1995**, 373, 257.

Cremalleras de leucinas

En el apartado anterior se ha explicado que las regiones de cremalleras de leucinas son las encargadas de la dimerización en las proteínas de tipo bZip como Fos y Jun. Además, constituyen uno de los motivos de oligomerización principales de subunidades proteicas.⁵⁹ A pesar de su simplicidad, es un motivo de plegamiento altamente versátil. La secuencia concreta del dominio de cremallera de leucinas determina elementos fundamentales como el estado de oligomerización preferente, rigidez o capacidad para funcionar como un sistema de reconocimiento molecular. Las secuencias de las cremalleras de leucinas paralelas se caracterizan por una periodicidad de siete residuos (-**a-b-c-d-e-f-g**-), con la aparición de residuos apolares preferentemente en la primera (**a**) y cuarta (**d**) posición de la heptada. La estabilidad de las cremalleras es fundamentalmente una consecuencia del empaquetamiento de las cadenas laterales apolares (normalmente Leu e Ile) formando un núcleo hidrofóbico.

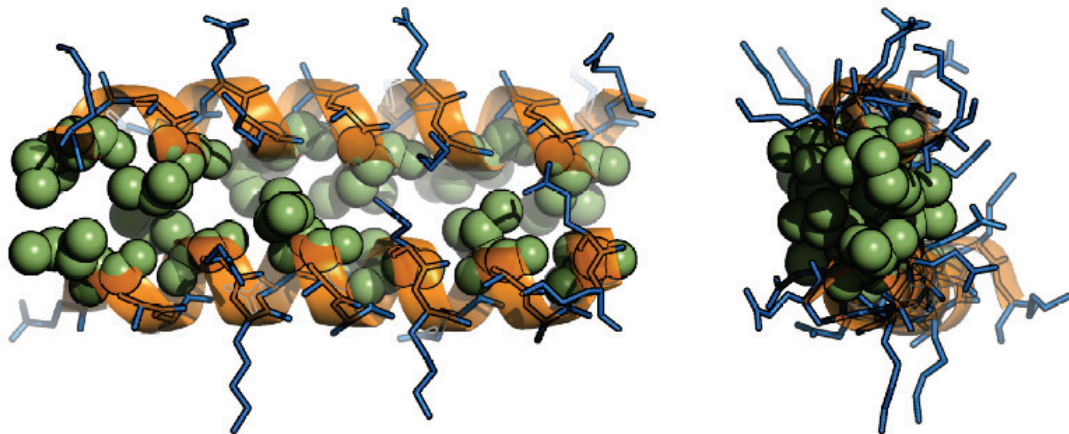


Figura 11. Vistas perpendiculares de una cremallera de leucinas. Se muestran en representación de esferas las Leu e Ile en las posiciones interiores de la cremallera formando el núcleo hidrofóbico. Se muestra a la derecha una vista a lo largo del eje de la cremallera.

El espaciado regular de los aminoácidos hidrofóbicos en un patrón -**a-b-c-d-e-f-g**- es crítico para la formación de la cremallera de leucinas. La proyección helicoidal de estas estructuras, que se observa en la figura 12, muestra cómo las posiciones **a** y **d** quedan hacia la interfase entre las dos hélices, por lo que se

59 Parry, D. A. D.; Fraser, R. D. B.; Squire, J. M. J. *Struct. Biol.* **2008**, 163, 258.

favorece en estas posiciones la presencia de residuos apolares de Leu e Ile, que formarán un núcleo hidrofóbico que estabiliza la asociación.⁶⁰

Por otra parte, los residuos en las posiciones **b**, **c**, y **f** están orientados hacia el exterior de la cremallera de leucinas, por lo que suele tratarse de residuos hidrofílicos o cargados que favorecen la solubilidad, e incluyen también los residuos con funciones de reconocimiento. Finalmente, los residuos en posiciones **e** y **g** quedan enfrentados entre si, por lo que en muchos casos se observa complementariedad de carga entre estas posiciones, de tal modo que estabilizan aún más las asociaciones por atracción electrostática (R, K / E, D). Se ha encontrado que, en general, se requieren un mínimo de cuatro o cinco heptadas para obtener dímeros estables de cremalleras de leucinas.

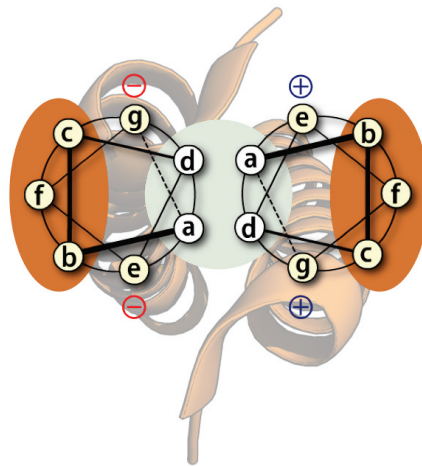


Figura 12. Proyección helicoidal de las hélices en una cremallera de leucinas idealizada. Las posiciones **a** y **d** forman el núcleo hidrofóbico que dirige la asociación mientras que las posiciones **e** y **g** contribuyen a la estabilidad y selectividad del complejo. Las posiciones **b**, **c** y **f**, no presentan función estructural.

60 a) Vinson, C.; Myakishev, M.; Acharya, A.; Mir, A. A.; Moll, J. R.; Bonovich, M. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 6321. b) Mason, J. M.; Arndt, K. M. *ChemBioChem* **2004**, 5, 170.

Modulación externa de la actividad de factores de transcripción

Dado que los factores de transcripción son los responsables de la regulación del proceso de transcripción y su activación errónea o excesiva está relacionada con la aparición de enfermedades como el cáncer, son dianas de gran relevancia desde el punto de vista terapéutico y diagnóstico. De hecho, algunos factores de transcripción pueden considerarse como biomarcadores de cáncer, por lo que poder detectarlos de forma selectiva y eficiente puede ser de gran ayuda a la hora de diagnosticar esta patología.

En los últimos años se han desarrollado algunas estrategias para controlar la actividad de diferentes factores de transcripción, aunque cabe decir que el trabajo realizado en este campo es aún muy escaso. A continuación se muestran algunos ejemplos.

Una aproximación general para la represión de la actividad de determinados genes consiste en el secuestro e inactivación de los factores de transcripción responsables de inducir su transcripción. Una de las tácticas utilizadas consiste en bloquear la actividad de los factores de transcripción que funcionan en forma de heterodímeros mediante **agentes dominantes negativos (D-N)**. Esta táctica se basa en forzar la heterodimerización con proteínas o péptidos que carecen del dominio de unión al ADN, de modo que secuestra la proteína natural en un complejo no activo. Desafortunadamente, para que estos D-Ns puedan ser efectivos deben estar en exceso para contrarrestar la tendencia a heterodimerizar del sistema natural.

Un ejemplo de D-Ns son los mutantes derivados de los factores de transcripción Fos y Jun que carecen de la región básica o de algunas de las Lys y Arg características de esta zona y, por tanto, impiden la formación de los complejos correspondientes con el ADN.⁶¹

Otro ejemplo de D-N para la inhibición de c-Jun se basa en el uso de fragmentos peptídicos de la cremallera de leucinas de Fos. Así, se llevaron a cabo experimentos de desplazamiento de la unión de c-Jun al ADN y se obtuvieron valores de interacción entre débiles y moderados (IC₅₀ de

61 Ransone, L. J.; Visvader, J.; Wamsley, P.; Verma, I. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3806.

11-12 μM) con péptidos derivados de Fos de 15, 25 y 32 aminoácidos (figura 13).⁶²

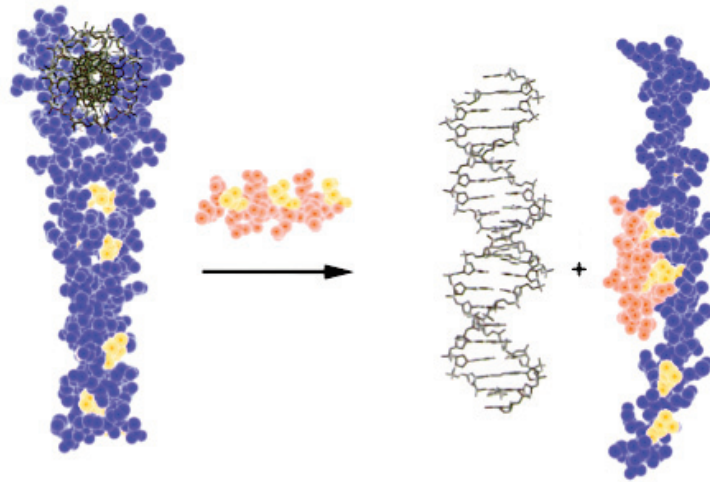


Figura 13. Estrategia para la inhibición de la dimerización de *c-Jun* (azul) con un péptido derivado de Fos (naranja). Tomada de la referencia 62.

Además, se ha descrito un método de preparación de D-Ns de factores de transcripción que impiden la unión al ADN en una competición equimolar. En el caso de los factores de transcripción de tipo bZip, estos D-Ns están formados por el dominio de dimerización de la cremallera de leucinas y una extensión acídica que sustituye a la región básica nativa, crítica para la unión al ADN.⁶³ Mediante esta estrategia se diseñó un D-N del complejo AP-1 en el que una extensión acídica de 28 aminoácidos se añade a 43 aminoácidos de la cremallera de leucinas de Fos. Dicha extensión forma un *coiled-coil* heterodimérico con la región básica de Jun e impide su unión al ADN.⁶⁴

62 Yao, S.; Brickner, M.; Pares-Matos, E. I.; Chmielewski, J. *Biopolymers* **1998**, 47, 277.

63 Krylov, D.; Olive, M.; Vinson, C. *EMBO J.* **1995**, 14, 5329.

64 Olive, M.; Krylov, D.; Echlin, D. R.; Gardner, K.; Taparowsky, E.; Vinson, C. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 18586.

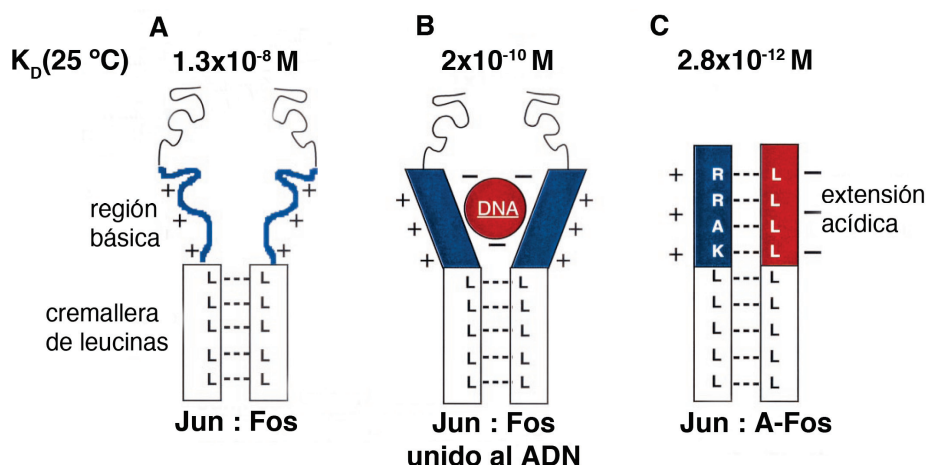


Figura 14. Representación esquemática del D-N del complejo AP-1. Tomada de la referencia 64.

Otro ejemplo de sistema que se encarga de reconocer y secuestrar al factor de transcripción c-Jun es el basado en conjugados oligonucleótido-péptido. Estas moléculas, que presentan una parte peptídica de 35 aminoácidos correspondiente a la cremalleras de leucinas de c-Fos unida a un oligonucleótido que contiene la secuencia de reconocimiento de Jun, poseen gran afinidad y selectividad por c-Jun.⁶⁵

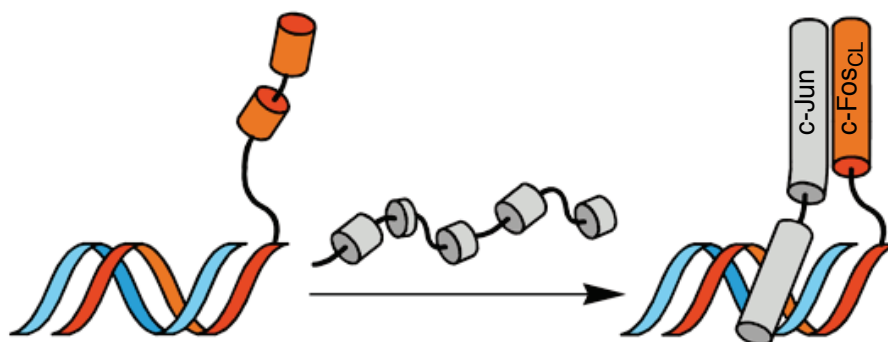


Figura 15. Representación esquemática de la estrategia basada en conjugados oligonucleótido-péptido.

En los últimos años se han desarrollado otro tipo de moléculas que inhiben los procesos de transcripción génica aparentemente bloqueando la actividad de factores de transcripción, aunque aun no se conoce bien su mecanismo de acción.^{34,66} Curiosamente, a pesar de su posible relevancia en diagnóstico, el desarrollo de sensores específicos para detectar factores de transcripción o proteínas implicadas en cáncer está mucho menos avanzado.

65 Portela, C.; Albericio, F.; Eritja, R.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1110.

66 Pazos, E.; Mosquera, J.; Vázquez, M. E.; Mascareñas, J. L. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1958.

Por todo lo expuesto, uno de los objetivos de nuestro trabajo consiste en *desarrollar sensores de biomoléculas implicadas en cáncer*. Concretamente, sensores ópticos de la proteína quinasa C, de ciclina A y de factores de transcripción basados en cremalleras de leucinas. Además de su posible relevancia para poder avanzar en la detección del cáncer, estos sensores podrían ser herramientas valiosas para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el control del ciclo celular y de la transcripción génica y podrían utilizarse como instrumento, mediante el desarrollo de ensayos de competición, para la identificación de nuevos inhibidores con posibles aplicaciones farmacológicas.

Las estrategias que se usarán para los diseños de los sensores se basan en técnicas luminiscentes, por lo que a continuación se presenta un resumen de estas técnicas y de algunos precedentes sobre su utilización con el fin de facilitar el entendimiento de nuestros diseños y resultados.

Luminiscencia

Conceptos generales

La utilización de técnicas luminiscentes en investigación biológica ha aumentado considerablemente durante los últimos años debido a su simplicidad, a su alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de obtener información espacial y temporal con gran resolución. Estas técnicas han encontrado aplicación tanto en el estudio de la estructura y dinámica de las biomoléculas como de sus funciones e interacciones.⁶⁷

Se denomina **luminiscencia** a la emisión de fotones desde especies electrónicamente excitadas. Existen numerosos tipos de luminiscencia que se clasifican en función del modo de excitación. Así, entre otros, se consideran clases de luminiscencia los siguientes ejemplos: **fotoluminiscencia** (fluorescencia y fosforescencia), que se caracteriza porque las moléculas se excitan por absorción de luz (fotones); **electroluminiscencia**, en la que las especies se excitan a través de un campo eléctrico; o **quimioluminiscencia** y **bioluminiscencia**, cuando las moléculas se excitan por procesos químicos o biológicos.⁶⁸

Cuando una molécula se excita por absorción de un fotón suele regresar al estado fundamental mediante la emisión de **fluorescencia**, pero también son posibles otras vías de desactivación como: **conversión interna** (que origina la vuelta al estado fundamental sin emisión de fluorescencia), **cruce intersistema** (que posiblemente esté seguido por la emisión de **fosforescencia**, como se observa en la figura 16), además de interacciones con otras moléculas de su entorno dando lugar a **procesos de transferencia electrónica** o formación de **excímeros** o **excíplejos**.

Generalmente y salvo pocas excepciones, la emisión de fluorescencia se produce entre los niveles $S_1 \rightarrow S_0$.⁶⁹ La emisión de fosforescencia se debe a la transición entre los niveles $T_1 \rightarrow S_0$ y es un proceso prohibido que generalmente no se observa a temperatura ambiente y en disolución ya que son más rápidos

67 Pazos, E.; Vázquez, O.; Mascareñas, J. L.; Vázquez, M. E. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3348.

68 Valeur, B. Introduction. *Molecular fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp 3-19.

69 Valeur, B. Characteristics of fluorescence emission. *Molecular fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp 34-71.

otros procesos de desactivación no emisivos. En cambio, a bajas temperaturas y/o en medios rígidos, puede observarse la emisión de fosforescencia. Además, el tiempo de vida en el estado triplete es suficientemente largo como para que pueda producirse la emisión durante segundos, minutos o más tiempo. Se define el rendimiento cuántico de fluorescencia como la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones incidentes.

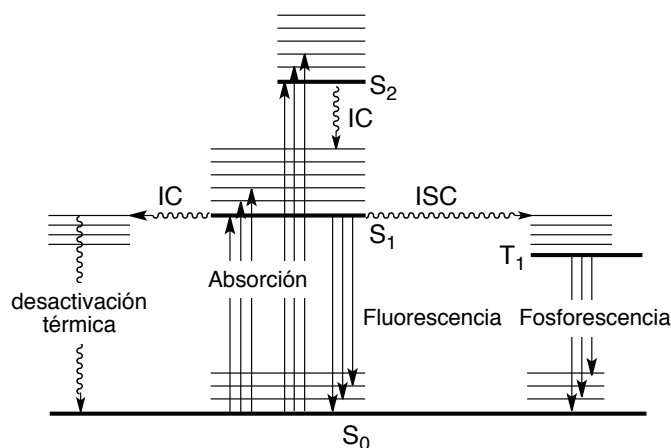


Figura 16. Diagrama de Jablonski de los principales procesos que se pueden producir cuando una molécula absorbe un fotón y pasa a un estado excitado. La molécula también puede volver al estado fundamental mediante un proceso de desactivación no radiativo o intercambiar su estado excitado de singlete a triplete en un proceso conocido como cruce intersistemas.

En un proceso de emisión de fotoluminiscencia, el espectro, el rendimiento cuántico y el tiempo de vida se ven afectados por las interacciones que se producen entre la molécula excitada y sus proximidades, lo que permite obtener información sobre el microentorno de la molécula fotoluminiscente. El estado excitado puede evolucionar a través de multitud de procesos que influirán en los parámetros de luminiscencia.

Uno de los procesos que se usan ampliamente para estudiar distancias en biomoléculas y asociaciones o ensamblajes supramoleculares es el fenómeno de FRET (acrónimo de **Fluorescence Resonance Energy Transfer**, o **Förster Resonance Energy Transfer**). Este fenómeno ocurre entre dos fluoróforos en los cuales las transiciones vibrónicas del dador tienen una energía prácticamente igual a las correspondientes transiciones en el aceptor. Dichas transiciones están acopladas, o lo que es lo mismo, están en resonancia.⁷⁰

70 Valeur, B. Effects of intermolecular photophysical processes on fluorescence emission. *Molecular fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp 72-124.

Según la teoría de FRET desarrollada por Förster^{71,72} la eficiencia en la transferencia de energía se define a través de la siguiente relación:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

Como se observa, el fenómeno de FRET depende tremendamente de la distancia entre los fluoróforos (r), así como de la distancia de Förster (R_0), que es la distancia crítica para que tenga lugar la transferencia de energía y que se define como la distancia a la cual la transferencia de energía tiene una eficiencia del 50%, variando típicamente entre los 20 y 60 Å para los fluoróforos orgánicos.

Sensores fluorescentes

Sensores fluorescentes sensibles a la polaridad del medio

La polaridad juega un papel muy importante en numerosos fenómenos físicos, químicos, bioquímicos y biológicos. Desde 1862 se conoce bien la gran influencia de los disolventes en la velocidad de las reacciones y en el equilibrio químico.⁷³ Esta dependencia del disolvente también se observa en espectros de distintas especies medidos mediante distintas técnicas espectrométricas (UV/VIS, IR, fluorescencia, RMN, etc.).⁷⁴

Los cambios en bandas de absorción o emisión pueden ser producidos por cambios de disolvente o de la composición del mismo. Estos cambios se conocen como cambios *solvatocrómicos* y son evidencia experimental del cambio

-
- 71 Valeur, B. Resonance energy transfer and its applications. *Molecular fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp 247-272.
- 72 a) Wu, P.; Brand, L. *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 1. b) Förster, T. Delocalized excitation and excitation transfer. *Modern Quantum Chemistry*; Sinanoglu, O., Ed.; Academic Press: New York, 1965; Vol. III, pp 93-137.
- 73 a) Reichardt, C. Solvent Effects on the Position of Homogeneous Chemical Equilibria. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2003; pp 93-146. b) Reichardt, C. Solvent Effects on the Rates of Homogeneous Chemical Reactions. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2003; pp 147-328.
- 74 a) Kosower, E. J. *Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3253. b) Haidekker, M. A.; Brady, T. P.; Lichlyter, D.; Theodorakis, E. A. *Bioorg. Chem.* **2005**, 33, 415. c) Reichardt, C. Solvent Effects on the Absorption Spectra of Organic Compounds. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*; Wiley-VCH: Weinheim, 2003; pp 329-388.

de la energía de solvatación. En otras palabras, cuando una molécula de soluto está rodeada de moléculas de disolvente su estado fundamental y su estado excitado están más o menos estabilizados en función de las interacciones que se producen entre el soluto y el disolvente. Por tanto, se denominan compuestos solvatocrómicos a aquellos cuyos espectros de absorción o emisión dependen de la polaridad del disolvente.⁷⁵

Existen numerosos compuestos sensibles a la polaridad del medio. Normalmente son compuestos que emiten débilmente en medios polares y, sobre todo, en disolventes próticos pero que, sin embargo, presentan un rendimiento cuántico de emisión elevado cuando se encuentran en disolventes hidrofóbicos o se transfieren a entornos apolares, como en membranas plasmáticas o bolsillos apolares de proteínas donde se encuentran menos expuestos al disolvente. No obstante, se conocen también moléculas que presentan mayor emisión en medios polares que apolares.⁷⁶

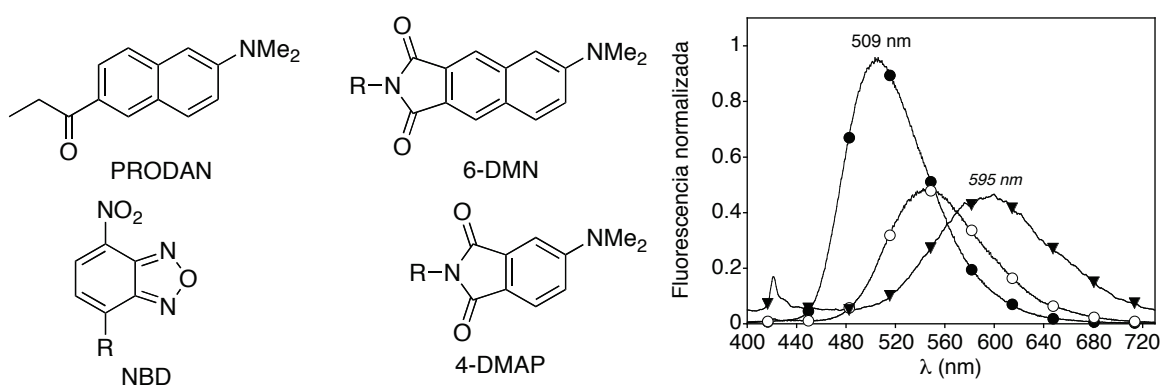


Figura 17. Estructura de compuestos fluorescentes sensibles a la polaridad. Espectros de emisión de 6-DMN en disolventes de distinta polaridad: (▼) MeOH, (○) DMF y (●) CHCl₃.

PRODAN (2-propionil-6-dimetilamino naftaleno), introducido hace más de 25 años,⁷⁷ y sus derivados son todavía muy utilizados como fluoróforos sensibles al medio a pesar de ciertas limitaciones que surgen debido a que presenta una intensidad relativamente alta en disolventes acuosos que da lugar a una señal de fondo muy elevada.

75 Valeur, B. Effect of polarity on fluorescence emission. *Polarity probes. Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp 200-225.

76 Uchiyama, S.; Takehira, K.; Yoshihara, T.; Tobita, S.; Ohwada, T. *Org. Lett.* **2006**, 8, 5869.

77 Weber, G.; Farris, F. J. *Biochemistry* **1979**, 18, 3075.

Recientemente se han publicado numerosos artículos que describen distintos fluoróforos que se utilizan como sensores en procesos biológicos. Existen precedentes de fluoróforos que se utilizaron como sensores en mecanismos de fosforilación dependientes de interacciones proteína-proteína. Un ejemplo es el caso de la familia de proteínas 14-3-3, cuyas interacciones se han estudiado utilizando fosfopéptidos que contienen aminoácidos no naturales derivados de los fluoróforos PRODAN⁷⁸ y 4-DMAP (4-dimetilaminofalimida)⁷⁹ (figura 18).

Otro ejemplo es el uso de fosfopéptidos que contienen un aminoácido no natural para estudiar las interacciones con el dominio SH2. En este caso se utiliza como aminoácido un derivado del fluoróforo 6-DMN (6-dimetilamino-2,3-naftalimida).⁸⁰ Posteriormente, se publicó el uso de este mismo aminoácido para monitorizar la unión de péptidos a las proteínas MHC de clase II en células vivas.⁸¹

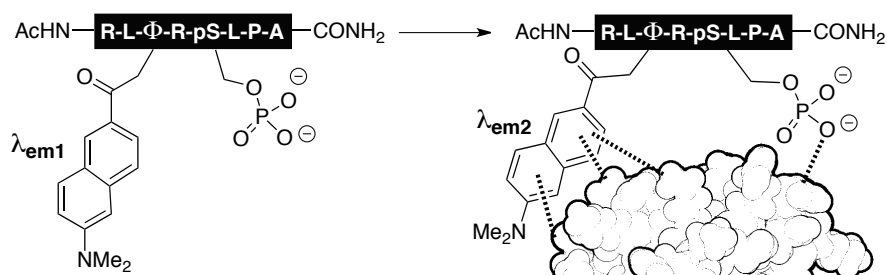


Figura 18. Representación del proceso de reconocimiento péptido-proteína en el que el fluoróforo sensible a la polaridad presenta un desplazamiento en la emisión y un aumento en el rendimiento cuántico en respuesta al entorno hidrofóbico en que se encuentra después de su unión a la proteína.

78 Vázquez, M. E.; Nitz, M.; Stehn, J.; Yaffe, M. B.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10150.

79 Vázquez, M. E.; Rothman, D. M.; Imperiali, B. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1965.

80 Vázquez, M. E.; Blanco, J. B.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1300.

81 Venkatraman, P.; Nguyen, T. T.; Sainlos, M.; Bilsel, O.; Chitta, S.; Imperiali, B.; Stern, L. *J. Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 222.

Complejos de lantánidos luminiscentes

Además del uso de fluoróforos orgánicos, los complejos de lantánidos son sistemas luminiscentes extremadamente interesantes. Muchos de los complejos de lantánidos trivalentes son luminiscentes pero algunos emiten más que otros. Las propiedades de emisión de los lantánidos dependen de la facilidad con la que pasan al estado excitado y de la minimización de la desactivación no radiativa.⁸²

En general, los complejos de lantánidos luminiscentes se caracterizan por presentar tiempos de vida excepcionalmente largos (milisegundos) y bandas de absorción extremadamente estrechas. Estas dos características permiten que su emisión se pueda medir fácilmente sin interferencias de la autofluorescencia de los medios biológicos y facilitan el desarrollo de sensores multicanal, por lo que resulta enormemente interesante el desarrollo de sensores basados en complejos de lantánidos trivalentes.

Los lantánidos trivalentes emiten luminiscencia por transiciones que implican a orbitales $4f$, que son prohibidas por las reglas de selección, y por lo tanto presentan un coeficiente de absorción extremadamente bajo (menor de $10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La baja absorción hace que los lantánidos trivalentes no se puedan excitar directamente por métodos normales e incluso aquellos que presentan un buen rendimiento cuántico raramente producen materiales altamente luminiscentes. Para solucionar este problema se recurre a un método de excitación indirecta conocido como **sensibilización** o **efecto antena**, por el que la excitación del metal se produce a través de la transferencia de energía de un ligando orgánico en un estado excitado que se encuentra próximo al lantánido.

La sensibilización produce la emisión de luminiscencia por parte del catión del lantánido mediante un proceso que consta de tres etapas esquematizadas en la figura siguiente:

1. La luz es absorbida en el entorno del Ln(III) por un cromóforo orgánico.
2. La excitación se transfiere desde el estado triplete del cromóforo a uno o varios estados excitados del ión metálico.
3. Se produce emisión de luminiscencia por parte del metal.

82 Bünzli J-C. G.; Piguet C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 1048.

En el proceso de sensibilización no es necesaria la unión directa entre el sensibilizador y el centro metálico, simplemente la proximidad de ambos en el espacio es suficiente. Se considera que el proceso será eficiente si ambas especies se encuentran a menos de 20 \AA .

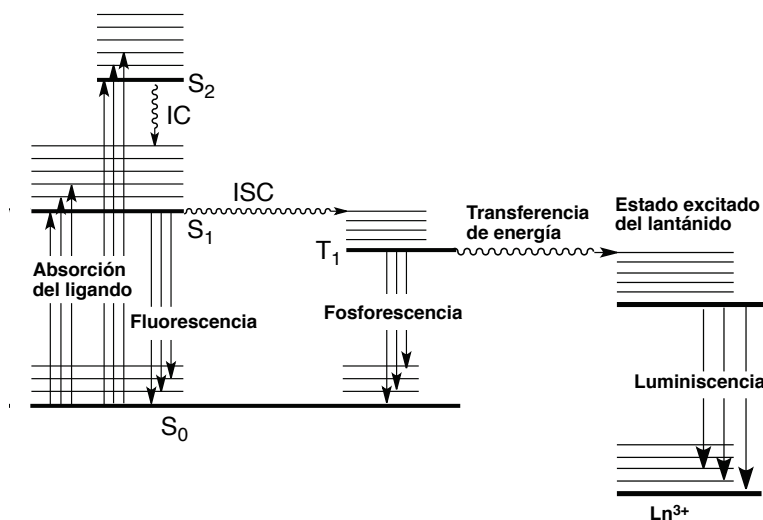


Figura 19. Diagrama simplificado en el que se ve la transferencia de energía durante la sensibilización.

En el diseño de sondas basadas en la emisión de los lantánidos, se intenta modular la luminiscencia mediante tres mecanismos que dependen de la concentración de un analito (figura 20):

- Interacción directa entre el analito y el ión lantánido: en ausencia de analito el complejo de Ln(III) no emite luminiscencia y cuando el analito se une a él si emite.
- El analito interfiere en las propiedades fotofísicas del complejo. Es decir, el complejo de Ln(III) pasa de emitir luminiscencia en ausencia de analito a no presentarla cuando el analito está presente.
- El analito actúa como especie sensibilizadora del complejo no luminiscente y una vez que el analito se encuentra a una distancia suficiente para que el proceso de sensibilización sea efectivo, se producirá la emisión de luminiscencia.

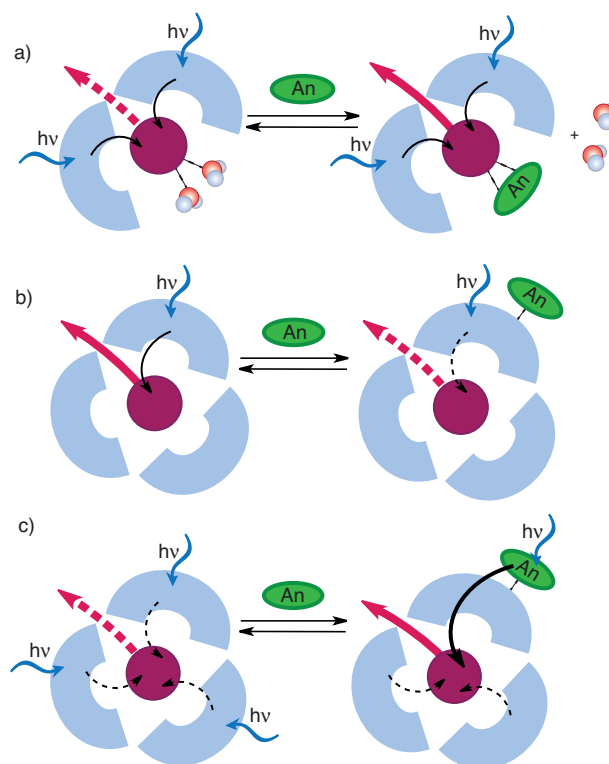


Figura 20. Mecanismos para la modulación de luminiscencia en sondas basadas en la modulación de la emisión de iones lantánidos por unión reversible a un analito: a) influencia directa sobre la luminiscencia del lantánido por desplazamiento de agua que actúa como desactivante de la luminiscencia; b) influencia en las propiedades fotofísicas del ligando por quenching de la señal de luminiscencia y c) adición de un analito que transforma un complejo pobremente emisor en un complejo luminiscente (reverso de b).

Sensores luminiscentes basados en complejos de lantánidos

El avance exponencial que se está produciendo en los últimos años en la identificación de dianas y marcadores biológicos hace que cada vez sea más necesario el desarrollo de métodos de sensibilización y de detección de biomoléculas o de procesos biológicos concretos.

Desde el principio de 1980 se han desarrollado numerosos sensores que cambian sus propiedades luminiscentes en respuesta a su interacción con especies químicas de interés y relevancia biológica como Ca^{2+} , $^{83}\text{Zn}^{2+}$, ^{84}NO , 85

83 Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 3440.

84 Minta, A.; Kao, J. P. Y.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 871.

85 a) Komatsu, K.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10197. b) Gee, K. R.; Zhou, Z. L.; Qian, W. J.; Kennedy, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 776.

y determinadas enzimas.⁸⁶ Sin embargo, estos sensores tienen limitaciones relacionadas con la autofluorescencia y difracción de la luz característicos de las muestras biológicas complejas. Estos factores pueden afectar considerablemente a la calidad de las medidas, especialmente cuando la escala de ensayo es pequeña o el marcador está en bajas concentraciones.

Los complejos de lantánidos luminiscentes constituyen una solución atractiva a estos problemas. Si se usa un agente quelatante adecuado, los complejos de lantánidos presentan tiempos de vida largos, del orden de milisegundos, que contrastan con los de los compuestos orgánicos típicos, con tiempos de vida del orden de los nanosegundos. Aprovechando esta propiedad, es posible eliminar la influencia de la señal de fondo biológica y la luz dispersada mediante el método llamado **luminiscencia resuelta en el tiempo**.⁸⁷ En esta técnica la señal de luminiscente se mide tras esperar un cierto tiempo después del pulso de excitación, de manera que sólo se recoja la señal correspondiente a las especies de tiempo de vida largo derivadas de los complejos de lantánidos.

Como ya se ha comentado, los sensores basados en complejos de lantánidos generalmente se excitan mediante transferencia de energía intramolecular desde residuos aromáticos que se encuentran próximos al metal.⁸⁸ Habitualmente se usan Tb(III) y Eu(III) ya que se pueden excitar por transferencia de energía con la mayoría de los cromóforos orgánicos y emiten de forma relativamente eficiente en el visible. Mediante el uso de esta estrategia de transferencia intramolecular ha sido posible desarrollar numerosos sensores como, por ejemplo, sensores de procesos de oxidación.⁸⁹ En este caso, el sensor presenta un diseño modular con una secuencia que favorece un giro β flanqueada por dos cisteínas. El extremo N-terminal contiene un complejo de Tb y el C-terminal el grupo que actuará como sensibilizador. Bajo condiciones oxidantes, las cisteínas forman un enlace disulfuro que une los extremos del

86 Kojima, H.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Kawahara, S.; Kirino, Y.; Nagoshi, H.; Hirata, Y.; Nagano, T. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2446.

87 a) Valeur, B. *Principles of steady-state and time-resolved fluorometric techniques. Molecular fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; pp 155-199. b) Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C.; Howard, J. A. K. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1977. c) Drøsing, A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 1425.

88 a) Gunnlaugsson, T.; Stomeo, F. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1999. b) Vázquez-Ibar, L.; Weinglass, A. B.; Kaback, H. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 3487.

89 Lee, K.; Dzubeck, V.; Latshaw, L.; Schneider, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13616.

péptido, permitiendo así una transferencia de energía eficiente y una alta emisión de luminiscencia por parte del ión metálico.

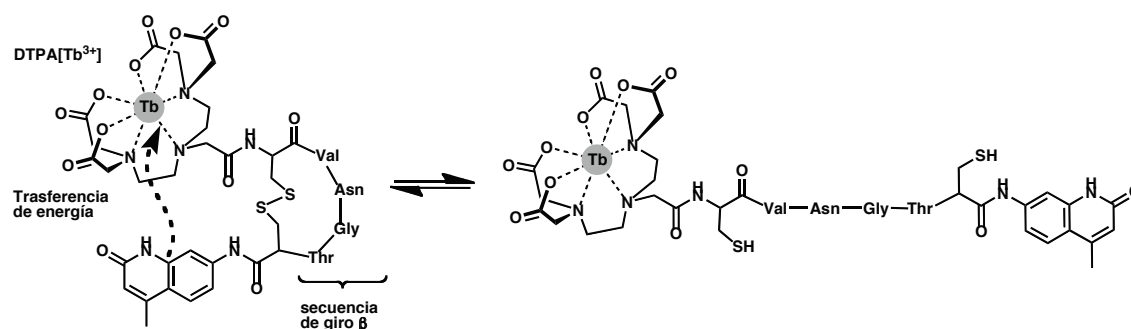


Figura 21. Sensores basados en la modulación de la transferencia de energía mediante el cambio de conformación del péptido.

Otro ejemplo basado en este mecanismo intramolecular son los sensores para fosforilación de tirosinas basados en péptidos cortos que contienen un grupo aminodiacetato próximo al sitio en que se produce la fosforilación. Como respuesta a la actividad de la quinasa, el sensor experimenta un aumento en la señal luminiscente debido a que cuando el péptido se encuentra fosforilado este es capaz de unir y sensibilizar los iones de Tb^{3+} y Eu^{3+} .⁹⁰

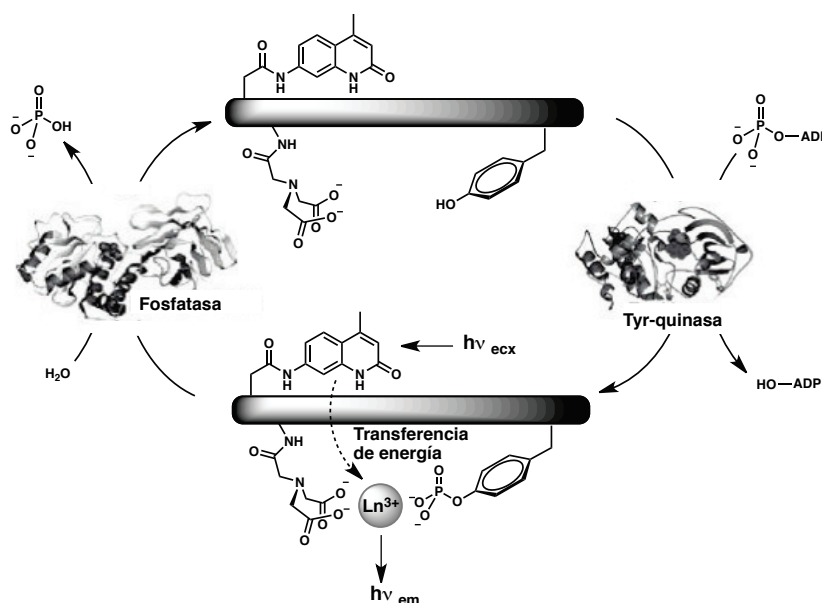


Figura 22. Diseño de un sensor de tirosin-quinasa/fosfatasa que coordina Ln^{3+} y cuya luminiscencia depende del estado de fosforilación.

En todos los casos, los complejos de lantánidos luminiscentes incorporan la antena que permite la excitación en el propio complejo metálico. A pesar de

90 Tremblay, M. S.; Lee, M.; Sames, D. *Org. Lett.* **2008**, 10, 5.

que no es necesaria la unión covalente de la antena al complejo con el metal, existen sólo un puñado de precedentes en la bibliografía de complejos de lantánidos no luminiscentes que aprovechen la unión a un analito para generar el efecto antena. Un ejemplo está en la aplicación de esta estrategia para el diseño de sensores de moléculas poliaromáticas basados en un complejo de Tb(III) con una unidad de ciclodextrina–DTPA (dietilentriaminopentaacetato) no luminiscente. Estos complejos ciclodextrina–DTPA no son luminiscentes por sí mismos y sólo la presencia de moléculas aromáticas dentro de la ciclodextrina permite la transferencia eficiente de energía al Ln(III).⁹¹

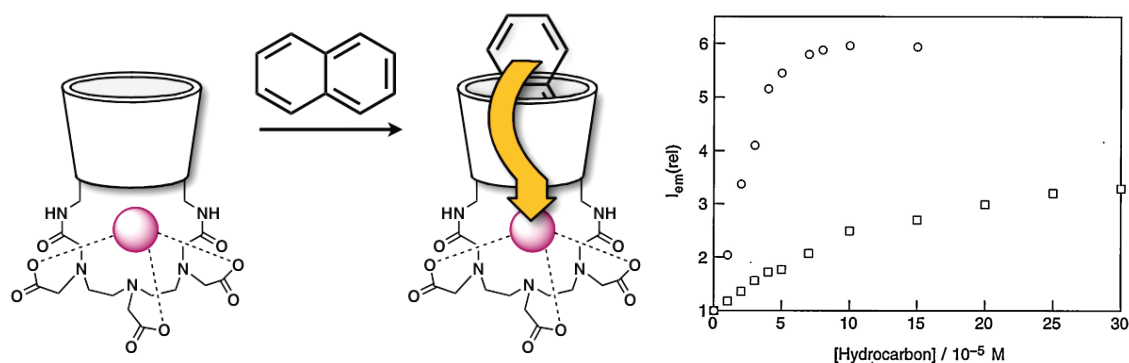


Figura 23. Transferencia de excitación desde moléculas poliaromáticas a complejos no luminiscentes de lantánidos y su aplicación como sensores. Gráfica tomada de la referencia 91.

Se ha descrito el uso de un residuo de Trp de la Glutamina Sintetasa de *Escherichia Coli* como sensibilizador de Tb(III).⁹² En este trabajo se utilizan los lantánidos como indicadores de las posiciones que los metales iónicos ocupan en la Glutamina Sintetasa y que son esenciales para su actividad, de tal modo que la proteína sólo emite luminiscencia cuando se encuentra unida a Tb(III) debida a la transferencia de la excitación por parte del Trp.

Recientemente se ha publicado el uso de residuos de Trp y Tyr presentes en el dominio BIR3 como sensibilizadores de péptidos derivados de Smac (inhibidor del dominio BIR3) que contienen el complejo DOTA-Tb para monitorizar su unión.⁹³ En este caso, se observa emisión de luminiscencia por parte del complejo metálico cuando está en presencia de la proteína debido a la transferencia de energía por parte de los residuos de Trp y Tyr al metal.

91 Mortellaro, M. A.; Nocera, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7414.

92 McNemar, L. S.; Lin, W-Y.; Eads, C. D.; Atkins, W. M.; Dombrosky, P.; Villafranca, J. *J. Biochemistry* **1991**, 30, 3417.

93 Allen, J. E.; McLendon, G. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 349, 1264.

Objetivos

Basándonos en los precedentes indicados con anterioridad, en este trabajo de tesis nos hemos fijado como objetivo el **desarrollo de estrategias para detectar proteínas implicadas en cáncer utilizando métodos luminiscentes**. Concretamente nos centraremos en dos proteínas implicadas en control de ciclo celular, **proteína quinasa C** y **ciclina A**, y en el factor de transcripción oncogénico **c-Jun**.

En todos los casos los diseños se realizan con el fin de que el proceso de reconocimiento e interacción con la diana biológica conlleve un cambio en las características emisivivas de un fluoróforo.

Sensores de proteína quinasa C

La idea básica para diseñar estos sensores consiste en incorporar en sustratos peptídicos de esta quinasa un **complejo de Tb(III) y un residuo de Trp (W)**, que permite la **emisión del metal por transferencia de energía intramolecular**, de tal forma que el sensor debería ser poco emisoro antes de que se produzca la fosforilación y producirse un aumento en la señal luminiscente del ión metálico una vez que el residuo de serina haya sido fosforilado. Esto se conseguiría debido a la interacción directa del fosfato con el terbio y al desplazamiento del agua que desactiva la emisión del metal.

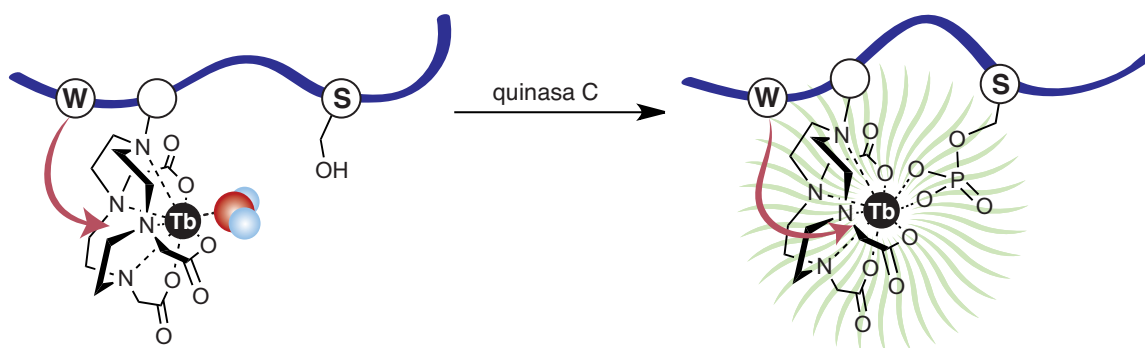


Figura 24. Emisión de luminiscencia producida como consecuencia de la fosforilación del residuo de serina próximo al complejo metálico y desplazamiento del agua que actúa como desactivante de la luminiscencia.

Sensores de ciclina A

Nos hemos planteado dos tipos de estrategias: una basada en el uso de complejos de lantánidos y otra en el de fluoróforos solvatocrómicos. En ambos casos las sondas se incorporan en secuencias peptídicas que se unen al surco de reconocimiento de los sustratos (CBG) presente en ciclina A.

Sensores basados en complejos de Tb(III)

Tal y como se indica en la figura, el fundamento de la estrategia es la sensibilización intermolecular del complejo metálico DTPA-[Tb³⁺] desde el residuo de Trp²¹⁷ presente en ciclina A y que se encuentra en la zona de unión del péptido. El complejo peptídico de Tb no debería ser luminiscente ya que carece de un sensibilizador. En cambio, cuando el péptido se encuentre unido a la proteína será posible el proceso de transferencia de energía induciendo así la emisión de luminiscencia como consecuencia de la unión.

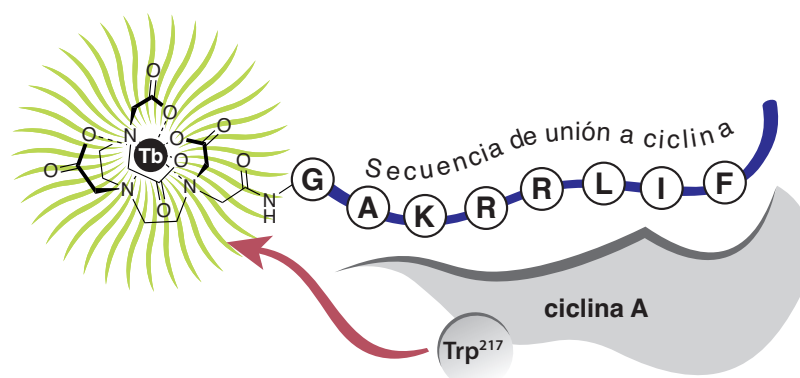


Figura 25. Mecanismo de emisión de luminiscencia producida por la transferencia intermolecular desde el residuo de Trp²¹⁷ a la sonda peptídica.

Sensores basados en fluoróforos solvatocrómicos

En este caso los péptidos incorporarán un aminoácido no natural derivado de los fluoróforos 4-DMAP o NBD. Estos fluoróforos presentan bajos rendimientos cuánticos cuando se encuentran en disolución acuosa y son altamente fluorescentes en disolventes polares apróticos y en entornos apolares, como es el surco hidrofóbico de ciclina A al que se unen los sustratos.

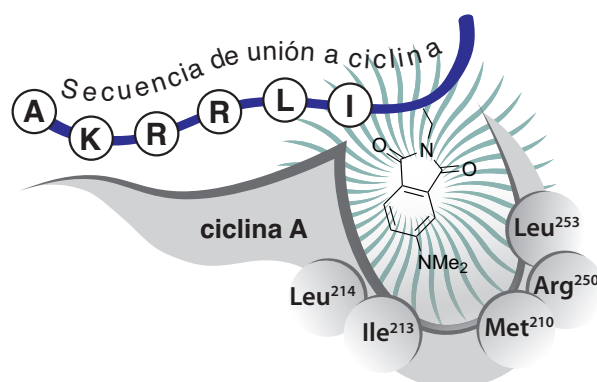


Figura 26. Representación del mecanismo de emisión de fluorescencia inducida por la interacción del péptido que contiene el fluoróforo solvatocrómico 4-DMAP con el surco hidrofóbico de ciclina.

Sensores de cremalleras de leucinas y del FT c-Jun

La estrategia supone el uso de cremalleras de leucinas modificadas que incorporan un complejo de lantánido DOTA[Tb³⁺] y un residuo de Trp dador en la misma cadena peptídica, de manera que el cambio conformacional producido por la dimerización de hélices α modifica la eficiencia en la transferencia de energía y por lo tanto la señal luminiscente.

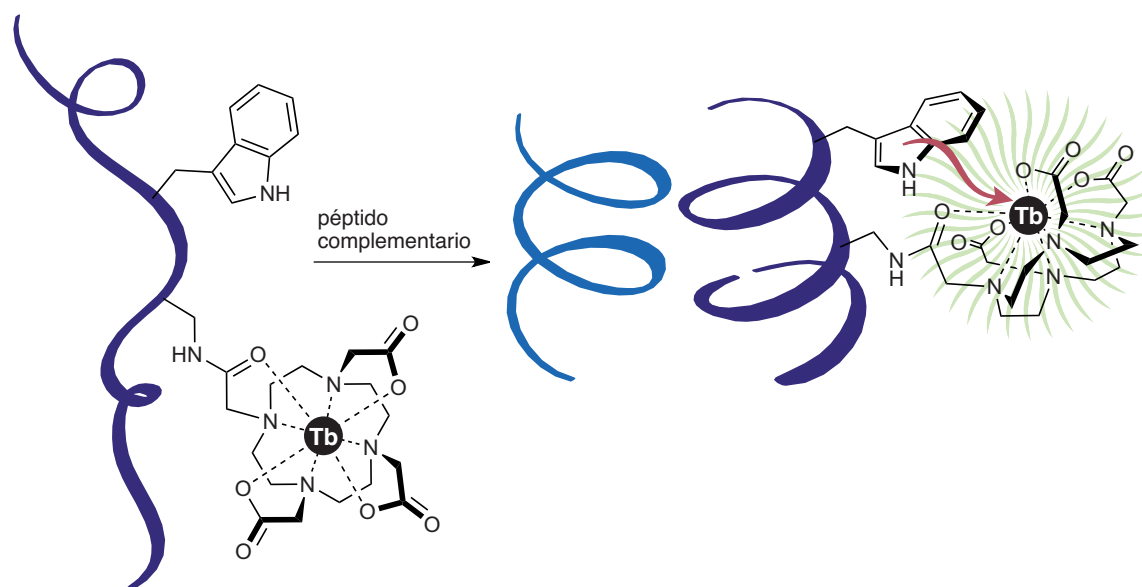


Figura 27. Representación del cambio conformacional producido por la dimerización de hélices α que supone una disminución en la distancia entre dador y aceptor y provoca un aumento en la emisión de la luminiscencia del complejo metálico.

Resultados y discusión

Sensores de proteína quinasa C

Diseño de complejos peptídicos de Tb(III) como sensores de proteína quinasa C

Es conocido que la coordinación de moléculas de agua a los iones de los lantánidos tiene un efecto drástico en su luminiscencia.⁹⁴ Esto es debido a que se produce un acoplamiento entre el estado excitado del ión metálico y los niveles vibracionales de las moléculas de agua próximas, lo que provoca la transferencia energética del metal a transiciones vibracionales de los enlaces O-H y la desactivación de su emisión.

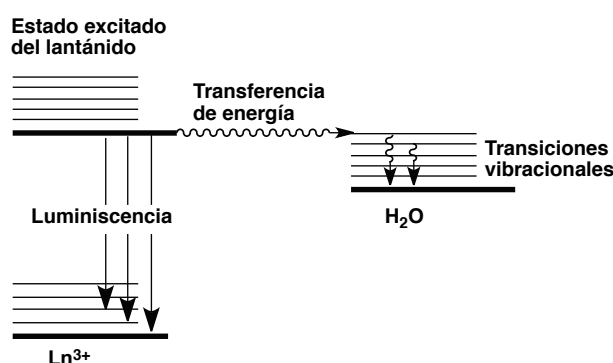


Figura 28. Representación del mecanismo de desactivación de la luminiscencia de los lantánidos a través de transiciones vibracionales de las moléculas de agua.

Teniendo en cuenta este efecto desactivante producido por el agua, nos planteamos diseñar un sensor de quinasas basado en el efecto que producen en la luminiscencia las moléculas de agua coordinadas a un ión Tb(III), de modo que el estado de fosforilación del péptido debería modificar de alguna manera la esfera de coordinación del metal. Con este fin, se diseñó un sensor que contiene la serina que será fosforilada en el extremo C-terminal de una secuencia de reconocimiento de la quinasa y un complejo macrocíclico de terbio, que será el elemento que genere la señal luminiscente después de la fosforilación. Este complejo está separado de la serina por una secuencia de giro β (Pro-Gly) que preorganiza la conformación del sensor. El sensor diseñado incluirá un residuo de Trp (W) que se usará como sensibilizador del

94 a) Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A. S.; Gareth Williams, J. A.; Woods, M. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 493.
 b) Nitz, M.; Sherawat, M.; Franz, K. J.; Peisach, E.; Allen, K. N.; Imperiali, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3682.

complejo de terbio mediante un proceso de transferencia de energía intramolecular.

Se eligió como lantánido el terbio, debido a que se puede excitar de forma efectiva desde el Trp y a que presenta buenas propiedades de emisión en el visible. El complejo metálico, basado en el DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), se ha seleccionado de manera que la falta de átomos en el ligando que se coordinen al terbio hace que este rellene las posiciones vacantes con moléculas de agua, por lo tanto el péptido sin fosforilar no debería ser emisoro. Una vez que el péptido haya sido fosforilado por la proteína quinasa C, el fosfato introducido en el residuo de serina debería coordinarse al terbio desplazando las moléculas de agua y produciendo un aumento en la señal luminiscente.

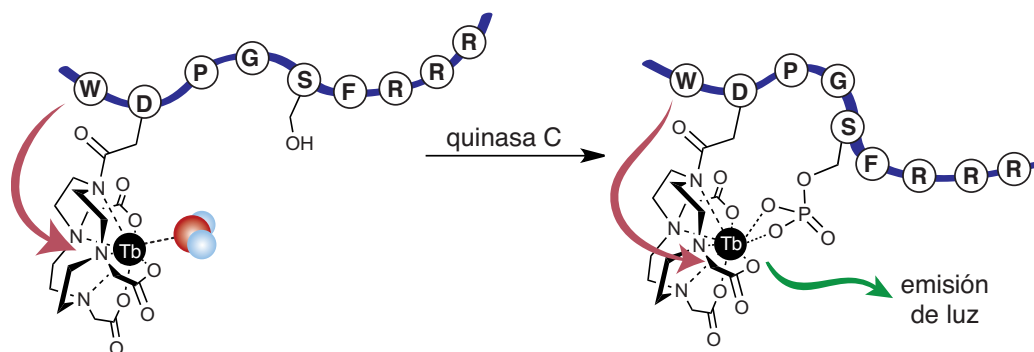
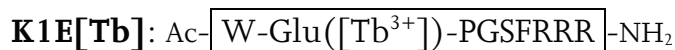
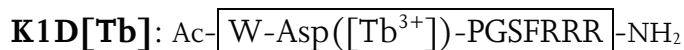
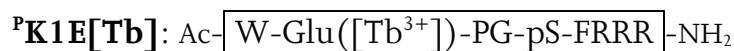
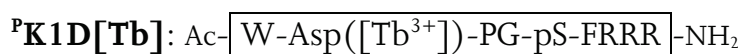


Figura 29. Representación del diseño del sensor de PKC en el que el complejo metálico está acoplado a un residuo de aspártico, antes (izquierda) y después de ser fosforilado por la proteína quinasa C (derecha).

Se diseñaron así dos péptidos cuya secuencia difiere en la naturaleza del aminoácido que se modifica para introducir el complejo, siendo en un caso Asp (D) y en el otro Glu (E).



Se sintetizaron también las versiones fosforiladas de los sensores **K1D[Tb]** y **K1E[Tb]** para comprobar si se produce la coordinación del fosfato al Tb^{3+} y caracterizar en detalle los dos estados del sensor (sin fosforilar/fosforilado) antes de realizar los ensayos con la proteína quinasa C.

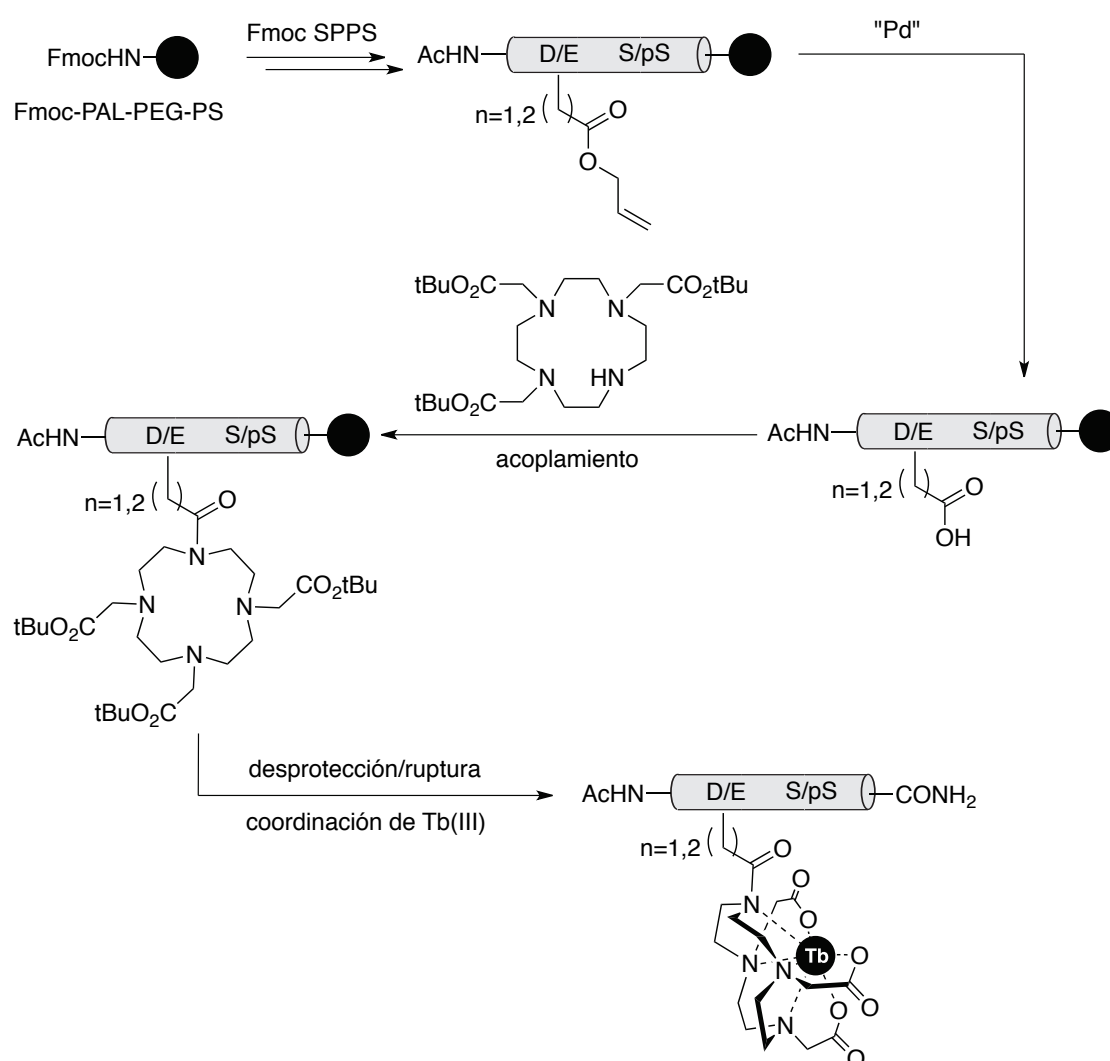


La nomenclatura seguida para los sensores de proteína quinasa C (**K**) hace referencia al estado de fosforilación (**P**) y al residuo cuya cadena lateral se modifica (**E/D**). Para mayor claridad, la secuencia de aminoácidos se enmarca con un rectángulo.

Síntesis

Planteamiento sintético

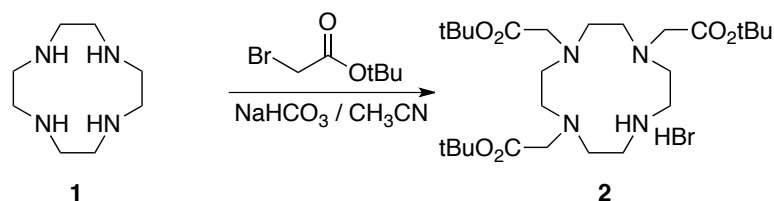
Para la síntesis de los complejos peptídicos de terbio **K1D[Tb]**, **K1E[Tb]**, **^PK1D[Tb]** y **^PK1E[Tb]** se planteó una estrategia basada en la síntesis de péptidos en fase sólida utilizando química Fmoc, aprovechando la modificación en la propia resina de los residuos Asp y Glu ortogonalmente desprotegidos y seguida de un acoplamiento del ligando al péptido, mientras este está unido al soporte sólido.



Esquema 1. Planteamiento general para la síntesis de los péptidos **K1D[Tb]**, **K1E[Tb]**, **^PK1D[Tb]** y **^PK1E[Tb]** en los que el cilindro representa la secuencia peptídica y S y pS se refiere los péptidos con serina o fosfoserina.

Síntesis del ligando macrocíclico

La síntesis del hidrobromuro de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (**2**) se realizó tal y como se indica en el siguiente esquema, siguiendo el procedimiento descrito en bibliografía.⁹⁵



Esquema 2. Procedimiento sintético utilizando como sustancia de partida el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano.

De forma resumida, se partió del 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (**1**) que se alquiló con bromoacetato de *tert*-butilo en presencia de NaHCO₃ anhidro en acetonitrilo a temperatura ambiente. El compuesto **2** se obtuvo por recristalización en tolueno como un sólido blanco con un rendimiento del 33%.

Síntesis de los derivados peptídicos KI

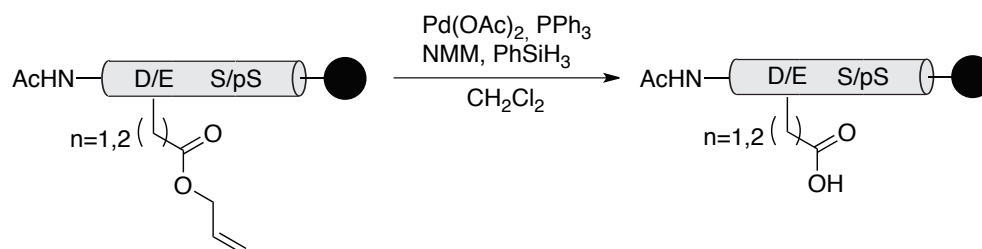
La síntesis de las secuencias peptídicas requeridas se realizó en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/*t*-Bu. Se utilizó como soporte sólido la resina Fmoc-PAL-PEG-PS que determina la funcionalización del extremo C-terminal del péptido como amida. Tanto el Glu como el Asp se introdujeron en los péptidos con su cadena lateral protegida por un grupo alilo. En la síntesis las versiones fosforiladas se utilizó el aminoácido comercial Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH para introducir el residuo de fosfoserina.

Una vez ensambladas las secuencias y después de acetilar el extremo N-terminal, se procedió a la desprotección selectiva del grupo alilo. Para ello se trata el péptido unido a la resina con PPh₃ (1.5 eq), *N*-metilmorfolina (NMM) (10 eq), PhSiH₃ (10 eq), y Pd(OAc)₂ (0.3 eq), en diclorometano.⁹⁶ La mezcla de reacción se agita durante 11 horas en atmósfera inerte.

95 Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 348.

96 a) Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7275. b) Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. *J. Peptide Res.* **2001**, 57, 250.

La resina resultante se filtra y lava con THF, DMF, dietilditiocarbamato (DEDTC) en DMF (para coordinar los restos de Pd que hubieran podido quedar en la resina),⁹⁷ DMF y CH₂Cl₂. El resultado de la síntesis se analiza por HPLC-MS.⁹⁸



Esquema 3. Eliminación del alilo de la cadena lateral de Asp y Glu de los péptidos.

A continuación se muestra el resultado obtenido en el caso del péptido **K1D**, que presenta un único pico en el cromatograma de HPLC y cuya masa se corresponde con la del producto deseado.⁹⁹

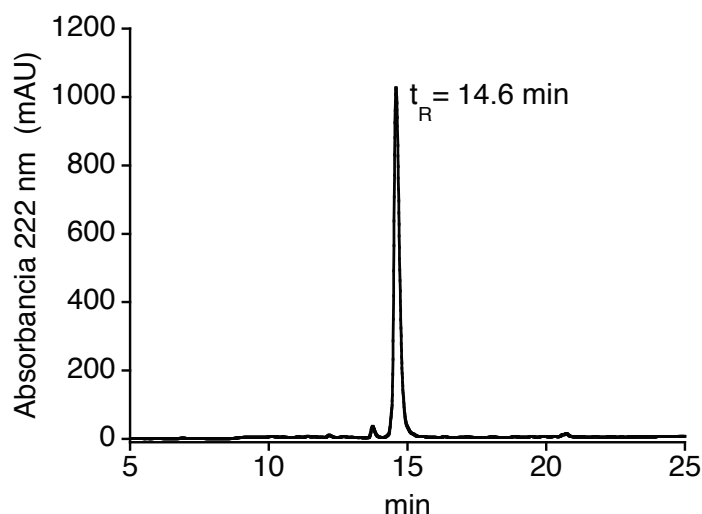


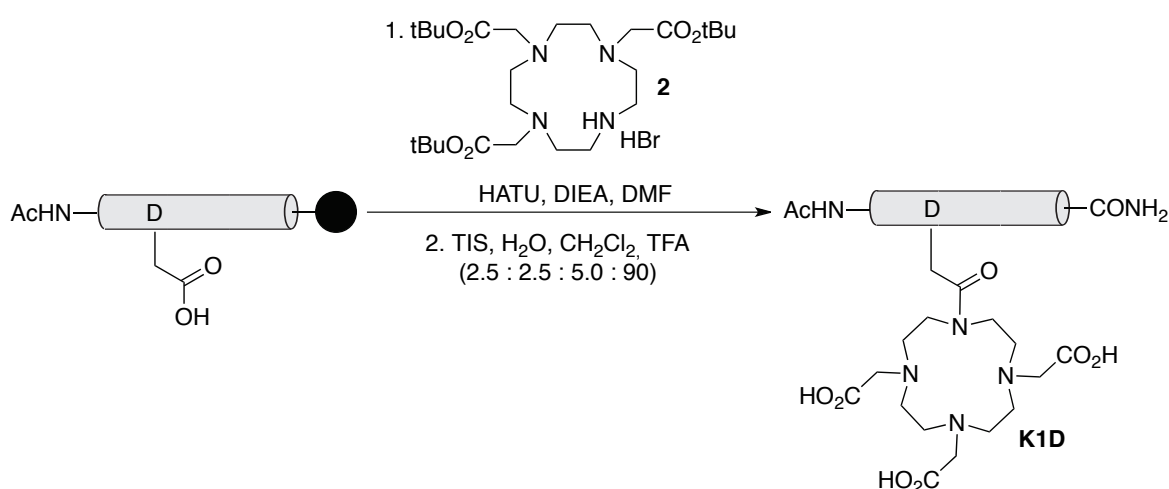
Figura 30. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina, en el que el pico de 14.6 min corresponde al péptido Ac-WDPGSFRRR-NH₂.

- 97 Leprince, J.; Oulyadi, H.; Vaudry, D.; Masmoudi, O.; Gandolfo, P.; Patte, C.; Costentin, J.; Fauchère, J.-L.; Davoust, D.; Vaudry, H.; Tonon, M.-C. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 6045.
- 98 Estos análisis se llevaron a cabo en todos los casos desprotegiendo una pequeña alícuota de la resina por tratamiento con una disolución de TFA y atrapadores de cationes, siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental.
- 99 Aunque a partir de ahora no se especifique en el texto, la identidad de todos los péptidos se confirmó mediante espectrometría de masas por ionización de electrospray (ESI).

Acoplamiento del ligando macrocíclico 2

Una vez desprotegida selectivamente la cadena lateral deseada se llevó a cabo el acoplamiento del ligando **2**, usando condiciones estándar de formación de enlaces amida en fase sólida.

La cadena lateral del residuo de Asp, que había sido ortogonalmente desprotegida, se activó *in situ* tratando la resina con HATU (1 eq) y DIEA (1.5 eq) en DMF durante 5 min. A continuación se añadió el ligando 1,4,7-tris(tert-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (**2**, 4 eq) y la mezcla resultante se agitó durante 4 h.



Esquema 4. Acoplamiento y ruptura/desprotección.

El posterior análisis de la reacción por HPLC-MS permitió comprobar que el acoplamiento se había producido satisfactoriamente, procediéndose entonces a la desprotección y ruptura del péptido de la resina utilizando el procedimiento estándar consistente en el tratamiento con la mezcla de desprotección [Triisopropilsilano (TIS), H₂O, CH₂Cl₂ y TFA en proporción 2.5: 2.5: 5.0: 90] y la posterior precipitación del péptido en éter. Finalmente, se procedió a la purificación del producto por HPLC en fase reversa y se liofilizó para la posterior coordinación del metal. El péptido **K1D** se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento aproximado del 23% para todo el proceso sintético.

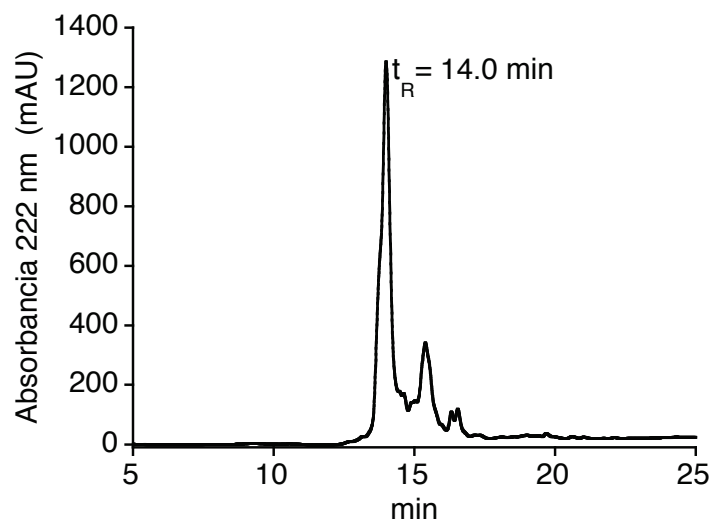


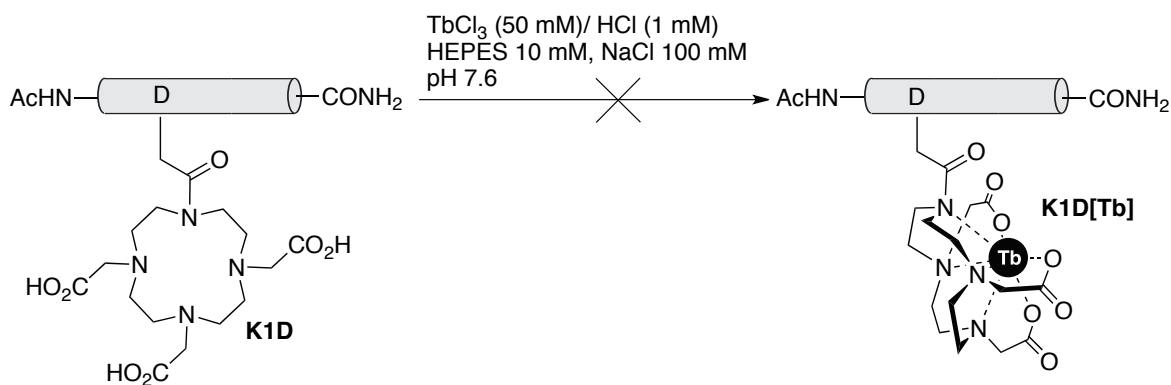
Figura 31. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 14.0 min corresponde al producto **K1D**.

Los demás péptidos **^PK1D**, **K1E** y **^PK1E** se sintetizaron de forma similar.

Coordinación de Tb^{3+}

Una vez que el péptido **K1D** se purificó y liofilizó, se procedió a la coordinación del ión Tb^{3+} . Para ello, el péptido se redisolvió en una disolución tamponada de HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, se añadió una disolución de $TbCl_3$ (50 mM) / HCl (1 mM) (10 eq) y la mezcla resultante se agitó durante una hora. El crudo de la reacción se analizó por HPLC-MS pero desafortunadamente no se observó la formación del producto de coordinación deseado **K1D[Tb]**. Ante estos resultados negativos, se probaron diversas condiciones de reacción, aumentando el tiempo, el número de equivalentes del metal o el pH de la disolución, pero en ningún caso se pudo detectar por HPLC-MS la formación del complejo deseado.

Tampoco en el caso de los demás péptidos **K1** se observó la formación de los complejos de Tb^{3+} .



Esquema 5. Procedimiento de coordinación del Tb^{3+} al péptido **K1D** para la obtención de **K1D[Tb]**.

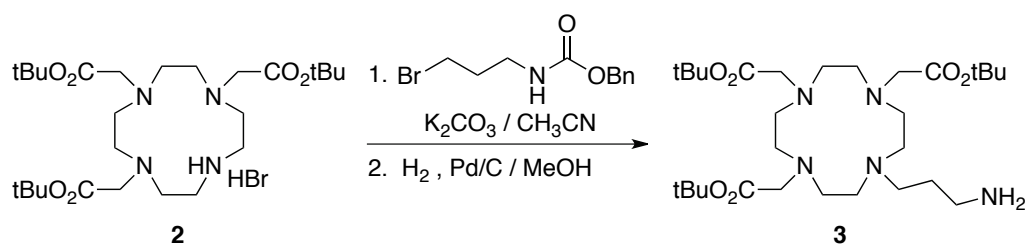
Es posible que las características de amida en el N del ligando a través del cual se conjuga al péptido impidan la coordinación del metal al afectar negativamente a la conformación del sistema cíclico quelatante y presentar al mismo tiempo propiedades coordinativas más pobres. Por este motivo se decidió modificar la estructura del ligando macrocíclico.

Síntesis del ligando macrocíclico modificado 3

Se modificó la estructura del ligando **2** de tal manera que todos los N del macrociclo se mantengan como aminas una vez que el ligando se encuentre conjugado al péptido. Para unir el macrociclo al péptido se pensó en introducir una cadena hidrocarbonada con una amina en el extremo para la conjugación con el péptido.

El ligando macrocíclico **3** se sintetizó según métodos ya descritos a partir del ligando **2**.¹⁰⁰ Para ello el 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano se alquiló con 3-bromopropilcarbamato de bencilo en presencia de K_2CO_3 anhidro, llevándose a cabo la reacción en acetonitrilo a reflujo. Después de una purificación por cromatografía en gel de sílice, el residuo se hidrogenó en presencia de Pd/C en metanol. La posterior filtración sobre celita y purificación en un sistema de cromatografía preparativa en fase reversa permitió aislar el producto **3** con un rendimiento total del 44%.

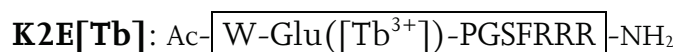
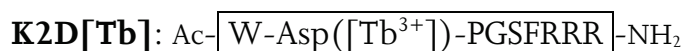
100 Dhingra, K.; Fousková, P.; Angelovski, G.; Maier, M. E.; Logothetis, N. K.; Tóth, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, 13, 35.



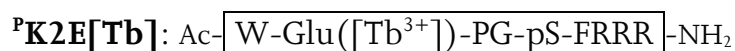
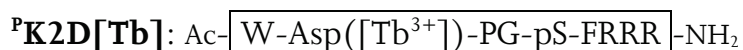
Esquema 6. Síntesis del ligando macrocíclico **3**.

Síntesis de los derivados peptídicos con el ligando macrocíclico modificado

Se abordó la síntesis de los siguientes péptidos equipados con el ligando modificado **3**:

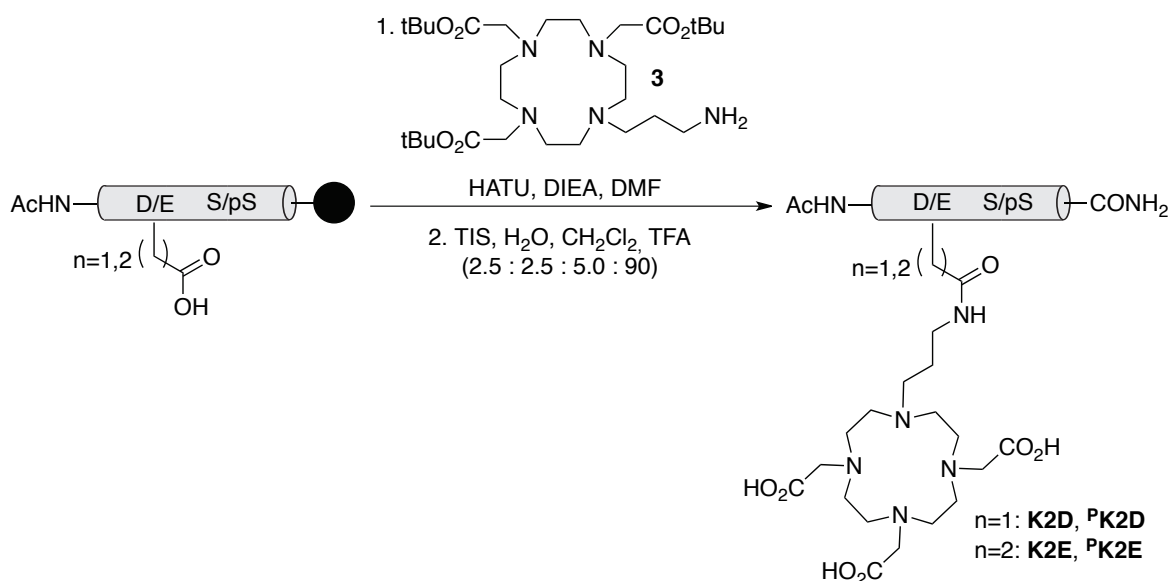


y sus correspondientes versiones fosforiladas:



Acoplamiento del ligando macrocíclico **3**

El acoplamiento se realizó sobre los péptidos unidos a la resina y selectivamente desprotegidos en las cadenas laterales de Asp o Glu. La cadena lateral acídica de los péptidos se activó con HATU y DIEA en DMF siguiendo las condiciones descritas anteriormente. Una vez activado el ácido *in situ*, se añadió la amina **3** y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas.



Esquema 7. Acoplamiento del ligando macrocíclico **3** en la cadena lateral de aspártico o glutámico.

El posterior análisis por HPLC-MS de cada uno de los péptidos permitió comprobar que el acoplamiento se había producido satisfactoriamente para los péptidos **K2E** y **^PK2E** pero que la reacción no se había completado para **K2D** y **^PK2D**, tal vez debido al mayor impedimento estérico para el acoplamiento con la cadena más corta del Asp. Por ello se procedió al reacoplamiento del ligando sobre estos dos péptidos en las mismas condiciones de reacción, con lo que la conversión ya es aproximadamente del 85%.

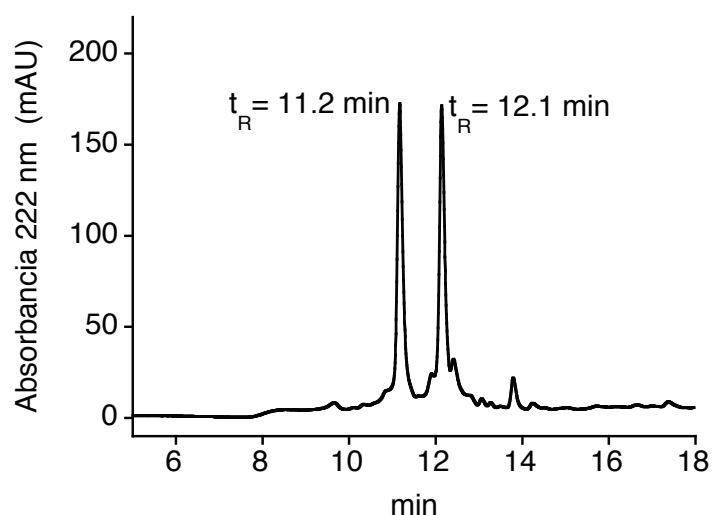


Figura 32. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina para obtener **K2D**, en el que se observa el producto con el ligando acoplado **K2D** (pico de 11.2 min) y el péptido sin acoplar (pico de 12.1 min).

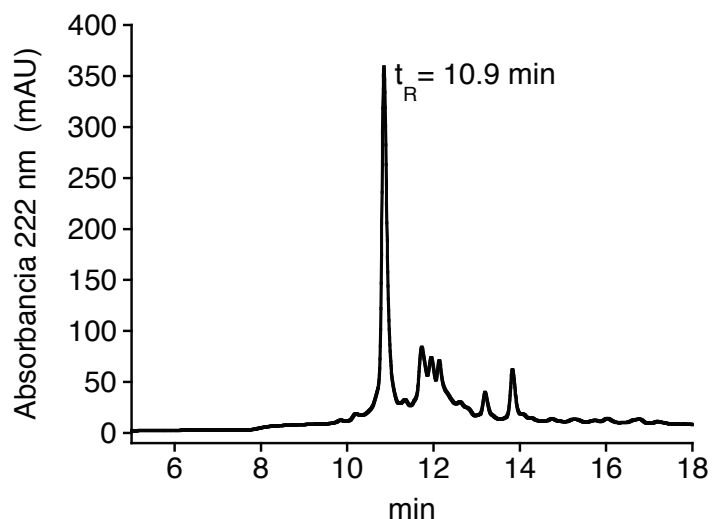
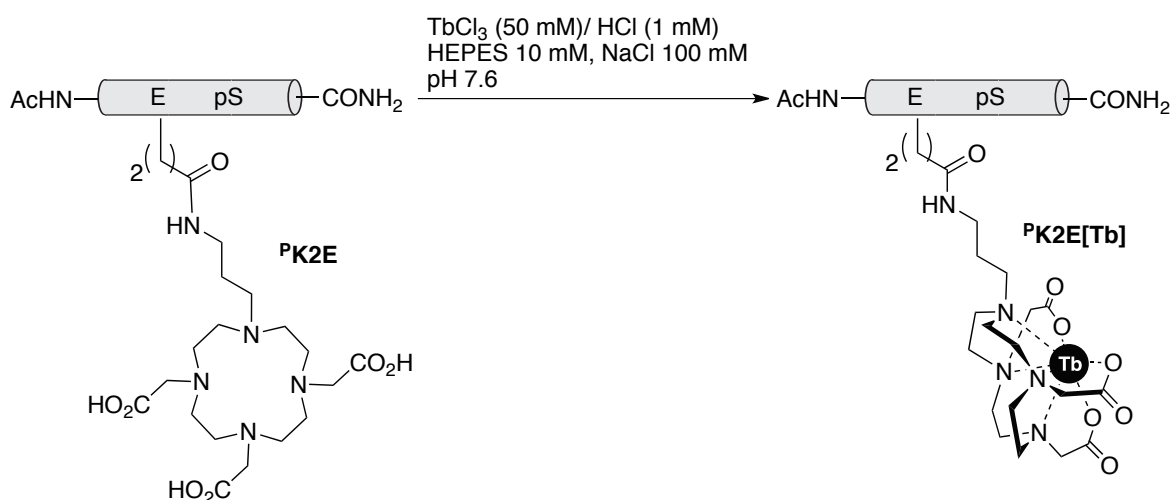


Figura 33. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina para dar **K2E**. El pico de 10.9 min corresponde al producto deseado.

Se procedió entonces a la desprotección y ruptura de la resina utilizando el procedimiento estándar consistente en el tratamiento de la resina con la mezcla de desprotección y la posterior precipitación del péptido en éter. Los productos se purificaron por HPLC en fase reversa. Los péptidos deseados se aislaron con rendimientos de 18-27%.

Coordinación de Tb^{3+}

El péptido $^P\mathbf{K2E}$ purificado por HPLC se redisolvió en una disolución tamponada de HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, se añadió una disolución de $TbCl_3$ (50 mM) / HCl (1 mM) (10 eq) y se agitó durante 1 h.



Esquema 8. Procedimiento para la obtención del complejo peptídico $^P\mathbf{K2E}[Tb]$.

El crudo de la reacción se analizó por HPLC-MS y no se observó la formación completa del producto de coordinación deseado, sino que también se observó un pico correspondiente al péptido sin el terbio. Para conseguir la coordinación total del metal se añadieron otros 20 eq del tricloruro de terbio y la reacción se dejó agitando durante 12 horas. El posterior análisis por HPLC-MS fue idéntico al anterior y no se observó mayor proporción del complejo metálico, lo que sugiere que el producto puede no ser lo suficientemente estable para soportar las condiciones del HPLC. Por este motivo se decidió examinar espectroscópicamente la formación de los complejos para confirmar la coordinación del metal, en este péptido y en los demás (**K2D**, **^PK2D** y **K2E**)

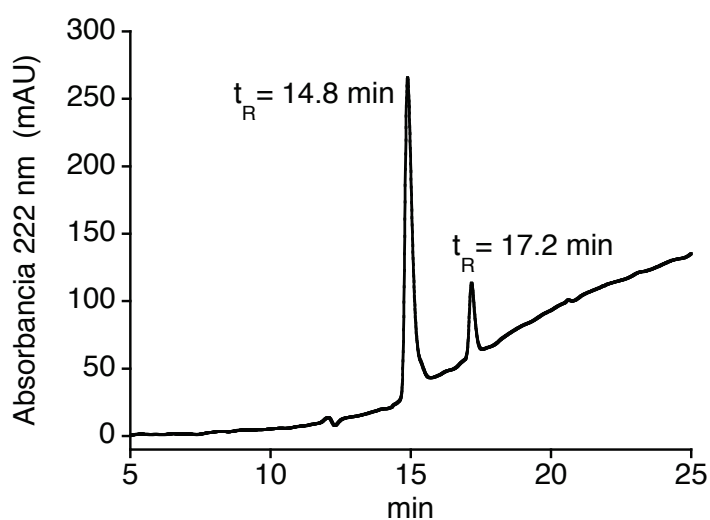


Figura 34. Cromatograma de HPLC-MS del crudo de la reacción, en el que el pico de 14.8 min corresponde al péptido sin el metal **^PK2E** y el de 17.2 min corresponde al complejo peptídico de terbio **^PK2E[Tb]**.

Ensayos de luminiscencia

Ensayos de luminiscencia para detectar la formación de los complejos metálicos

Los estudios de emisión de luminiscencia se realizaron con una disolución 10 μM de los péptidos **K2D**, **^PK2D**, **K2E** y **^PK2E** (sin terbio) en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, sobre la que se añadieron alícuotas de una disolución madre de TbCl_3 1 mM, recogiendo el espectro de emisión después de cada adición y excitando para ello a la longitud de onda característica de la antena de Trp ($\lambda = 280 \text{ nm}$).

En todos los casos se observó un aumento en la señal luminiscente característica del Tb hasta que se alcanzó la cantidad de un equivalente de metal en la disolución, manteniéndose prácticamente constante a partir de ese punto al seguir aumentando la concentración del ión metálico. Estos resultados sugieren que la formación de estos complejos peptídicos de terbio es inmediata, que no es necesario añadir exceso del metal para su formación y confirman que la complejación de Tb^{3+} es eficiente.

Sorprendentemente, se observó que la luminiscencia del péptido fosforilado (**^PK2D**) es menor que la del péptido análogo sin fosforilar (**K2D**). Estos resultados se pueden deber a que, al contrario de lo que se esperaba, las preferencias conformacionales y la geometría de los péptidos diseñados favorezcan la coordinación del hidroxilo de la serina del péptido sin fosforilar al terbio en lugar de hacerlo el grupo fosfato del residuo de fosfoserina. De este modo, para **^PK2D** quedarían posiciones vacantes en torno al metal que se completarían con moléculas de agua, lo que explicaría la menor intensidad de la señal luminiscente en el estado fosforilado.

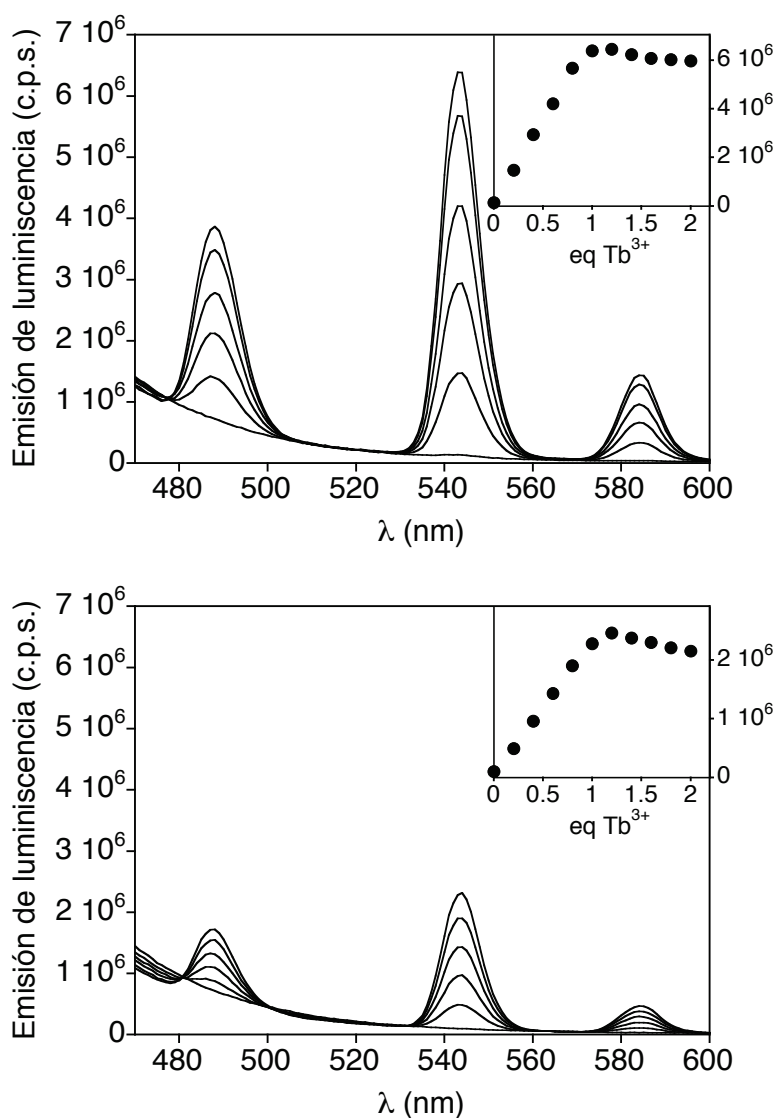


Figura 35. Espectros de luminiscencia de **K2D** (arriba) y de **^PK2D** (abajo) al ir añadiendo TbCl_3 , ambos en concentración $10 \mu\text{M}$ en HEPES 10 mM , NaCl 100 mM , $\text{pH} = 7.6$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$. Se representa también en cada caso el perfil de la valoración con Tb(III) a 545 nm que muestra la formación completa del complejo con 1 eq de metal.

Para los análogos con glutámico, **K2E** y **^PK2E**, no se observan diferencias significativas entre las dos gráficas (figura 36). Estos resultados podrían justificarse puesto que **K2E** presenta un átomo más de carbono en la cadena que actúa de conector entre el complejo metálico y el péptido que **K2D** y esa mayor distancia podría ser suficiente para que la coordinación de la serina o la fosfoserina al metal ya no sea geoméricamente favorable.

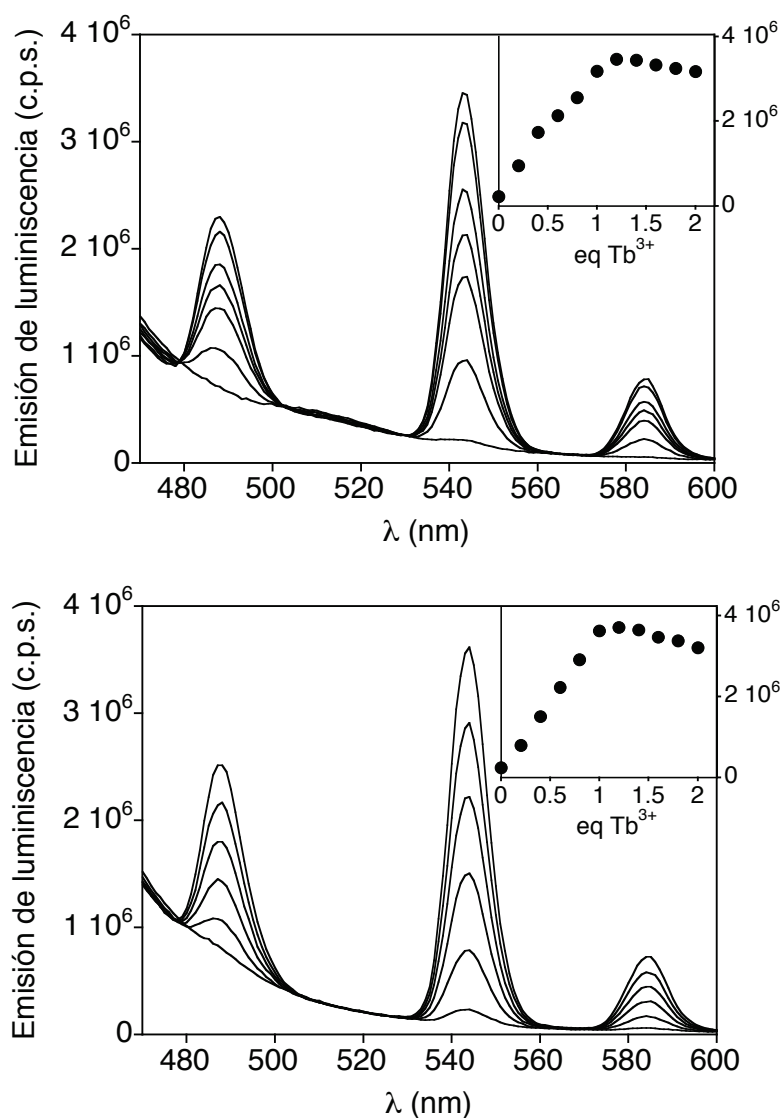


Figura 36. Espectros de luminiscencia de **K2E** (arriba) y de **P-K2E** (abajo), ambos en concentración $10 \mu M$ en HEPES 10 mM , NaCl 100 mM , $\text{pH} = 7.6$, $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$. Se representa el perfil de la valoración con $Tb(III)$ que muestra la formación completa del complejo con 1 eq de metal.

A continuación se muestra un diagrama de barras en el que se representan las intensidades máximas de emisión de los distintos complejos peptídicos de terbio a modo de resumen de los distintos resultados obtenidos para los diferentes péptidos.

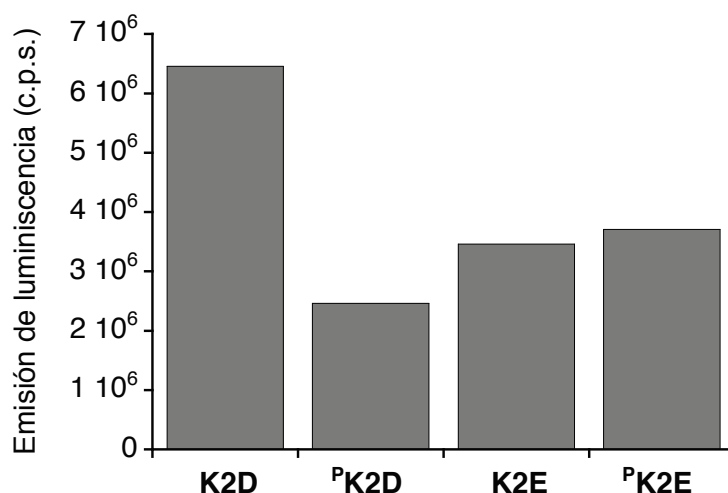


Figura 37. Comparación de la intensidad máxima de emisión de los distintos péptidos cuando complejan Tb^{3+} .

Para confirmar que existe una diferencia en la coordinación del metal entre **K2D** y ^P**K2D**, se pueden llevar a cabo estudios del tiempo de vida media del terbio y así calcular el número de moléculas de agua que existen en la esfera de coordinación del metal. Esto permitiría saber si las cadenas laterales de los aminoácidos cercanos juegan algún papel coordinándose, o no, al ión metálico.

Cálculo del número de moléculas de agua coordinadas al metal

Se han publicado estudios que relacionan los tiempos de vida de la luminiscencia de lantánidos en disolución con los resultados cristalográficos⁹⁴ y permiten relacionar el número de moléculas de agua (q) del Tb^{3+} con el tiempo de vida del complejo metálico en H_2O y D_2O . Esto se debe a que el acoplamiento entre el estado excitado del metal y los niveles vibracionales de las moléculas de agua próximas provoca la desactivación de la luminiscencia de los lantánidos a través de transiciones vibracionales de los enlaces O-H. En cambio, los niveles vibracionales del D_2O son distintos a los del H_2O y por tanto el acoplamiento entre el estado excitado del metal y estos niveles vibracionales es mucho menos efectivo.

Para calcular las moléculas de agua se mide el decaimiento en la intensidad de la emisión del complejo a 545 nm durante 15 ms después de un intervalo de 0.05 ms. Los datos obtenidos se ajustan a la ecuación exponencial: $I(t) = I(0)e^{-(t/\tau)}$, donde $I(t)$ es la intensidad a tiempo t después del pulso de

excitación, $I(0)$ es la intensidad inicial a $t = 0$ (después del intervalo de 0.05 ms), y τ es el tiempo de vida de la luminiscencia.

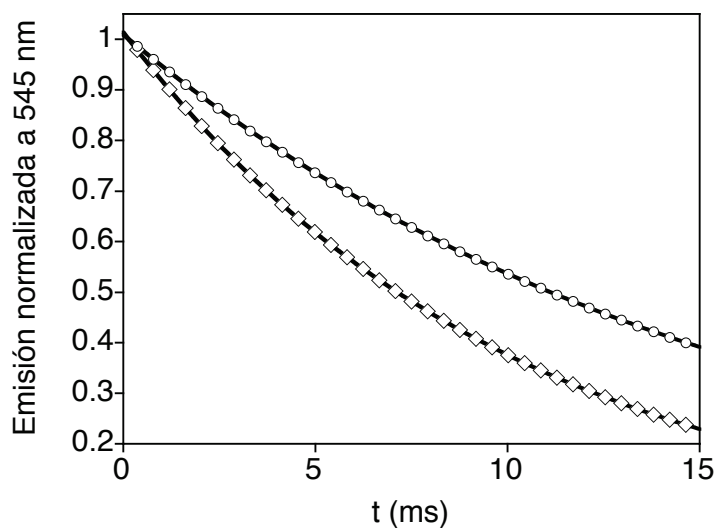


Figura 38. Representación de la emisión normalizada a 545 nm de **K2D** en función del tiempo. (\diamond) corresponde a la muestra en una disolución al 100% de H_2O y (\circ) corresponde a la muestra en una disolución al 80% en D_2O .

El número de moléculas de agua coordinadas se puede estimar midiendo la constante de velocidad del decaimiento de la luminiscencia (k o τ^{-1}), tanto en H_2O como en D_2O , y ajustando los datos a la ecuación:

$$q = A'(\Delta k_{\text{corr}}), \text{ donde } A' = 5 \text{ ms y } \Delta k_{\text{corr}} = (k_{H_2O} - k_{D_2O} - 0.06 \text{ ms}^{-1}) \text{ para } Tb^{3+}.$$

El valor de τ^{-1} en D_2O se estima midiendo los tiempos de vida de los complejos peptídicos de terbio en disolución variando la relación de H_2O : D_2O de 0.2 a 1. El valor de la ordenada en el origen de la gráfica que representa τ^{-1} frente a la fracción molar de H_2O se corresponde con el valor en D_2O pura.

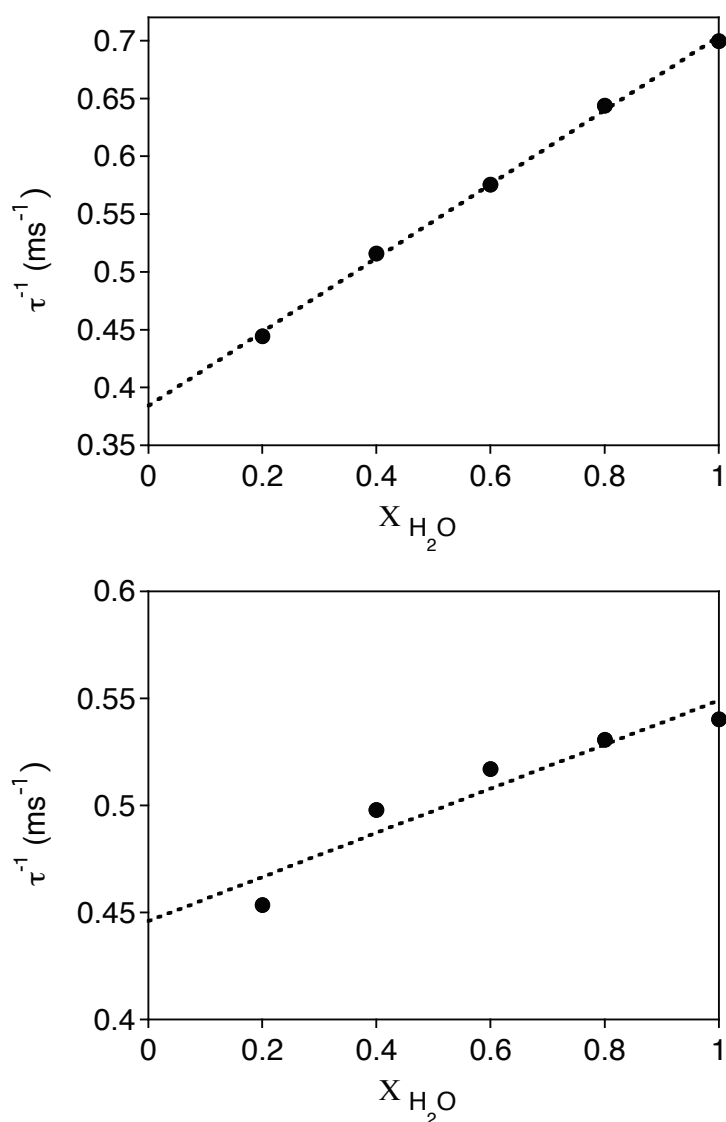


Figura 39. Representación de τ^{-1} frente a la fracción molar de H_2O para **K2D** (arriba) y **^PK2D** (abajo).

Los tiempos de vida determinados para **K2D** fueron de 1.43 ms en H_2O y 2.60 ms en D_2O . Estos valores permitieron determinar que el número de moléculas de agua para este complejo es de 1.27. Para el caso de **^PK2D** los tiempos de vida determinados fueron 1.85 ms en H_2O y 2.24 ms en D_2O , lo que proporcionó un número de moléculas de agua para este complejo de 0.17.

Estos resultados, que sugieren que **K2D** presenta una molécula de agua en la esfera de coordinación mientras que **^PK2D** no presenta ninguna, invalidan la hipótesis de que la mayor señal de **K2D** se debía a la saturación de la esfera de coordinación en torno al metal por la coordinación de la cadena lateral de Ser al mismo. Analizando y comparando las estructuras de ambos péptidos (que solo difieren en el grupo fosfato de la cadena lateral de Ser) con sus espectros

de emisión, se puede pensar que el fosfato se encuentra formando parte de la esfera de coordinación del metal en $^P\mathbf{K2D}$, haciendo que el complejo se distancie de la antena, mientras que en el caso del $\mathbf{K2D}$ ningún aminoácido está interaccionando con el complejo y este podría situarse más cerca del residuo de Trp, lo que explicaría la mayor señal luminiscente.

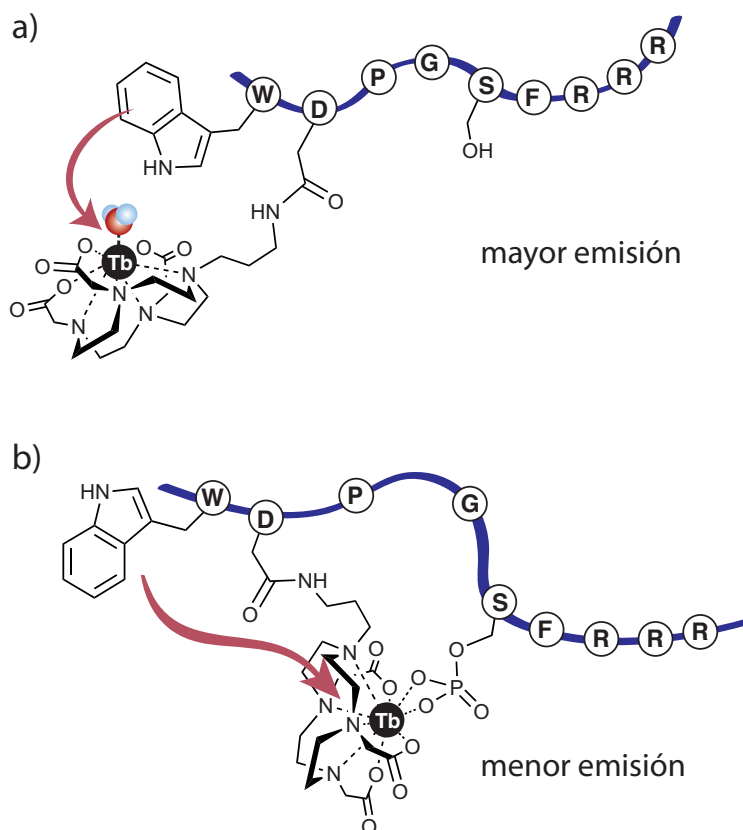


Figura 40. Representación que explicaría la mayor emisión de $\mathbf{K2D}$ debida a una menor distancia entre dador y aceptor (a) que en el caso de $^P\mathbf{K2D}$. Para $^P\mathbf{K2D}$, que no tiene moléculas de agua coordinadas al Tb, el efecto de la mayor distancia entre complejo y dador es lo que hace que la luminiscencia sea menor a pesar de que no se vea desactivada por no presentar moléculas de agua en la esfera de coordinación del terbio (b).

Conclusiones

Se han sintetizado varios péptidos diseñados para actuar como sensores de PKC. Estos péptidos incorporan en su secuencia un complejo quelatante de lantánidos coordinativamente insaturado y un residuo de Trp que permite la emisión del metal por transferencia de energía intramolecular.

Se demostró que la señal de luminiscencia del péptido **K2D** es sensible al estado de fosforilación de la serina y se comprobó que, cuando esta se encuentra fosforilada (**^PK2D**), el grupo fosfato interacciona con el metal desplazando la molécula de agua de la esfera de coordinación del Tb presente en el péptido sin fosforilar. Los resultados sugieren que la coordinación del grupo fosfato al metal aleja al complejo de terbio del Trp provocando así una transferencia de energía poco eficiente y con ello una disminución de la señal luminiscente del Tb.

Sensores de ciclina A basados en complejos de Tb(III)

Diseño de los sensores de ciclina A basados en complejos de Tb(III)

Como se ha comentado antes, la estrategia para detectar selectivamente la presencia de ciclina A se basa en la transferencia de energía intermolecular desde el residuo de Trp²¹⁷, presente en la zona de reconocimiento de los sustratos de ciclina A (CBG), al complejo de Tb(III) unido a un péptido que se une al CBG. Este complejo peptídico de terbio solo debería ser luminiscente cuando se encuentre unido a la proteína puesto que carece de un sensibilizador en su propia estructura.

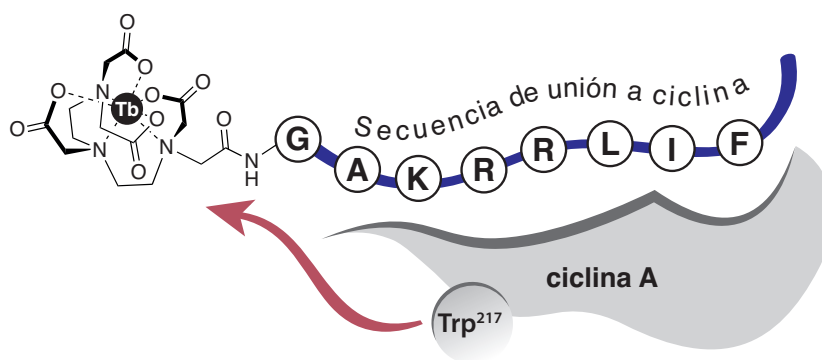


Figura 41. Planteamiento para la detección de ciclina A basado en la transferencia de energía intermolecular desde el Trp²¹⁷ al complejo peptídico.

Para diseñar los sensores hemos tomado como base la información estructural disponible de inhibidores de ciclina A unidos al surco de reconocimiento de los sustratos de la proteína (CBG), partiendo de la estructura del complejo de ciclina A con el fragmento peptídico 654-663 (GSAKRRLFGGE) del inhibidor natural p107.¹⁰¹

La estabilización del complejo se debe fundamentalmente a los contactos que se establecen entre el surco hidrofóbico de ciclina (formado por las hélices $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) y las cadenas laterales de Arg⁶⁵⁸, Leu⁶⁶⁰ y Phe⁶⁶¹ del péptido, además de los enlaces de hidrógeno que se producen con el esqueleto del péptido.

101 Lowe, E. D.; Tews, I.; Chen, K. Y.; Brown, N. R.; Gul, S.; Noble, M. E. M.; Gamblin, S. J.; Johnson, N. L. *Biochemistry* **2002**, 41, 15625.

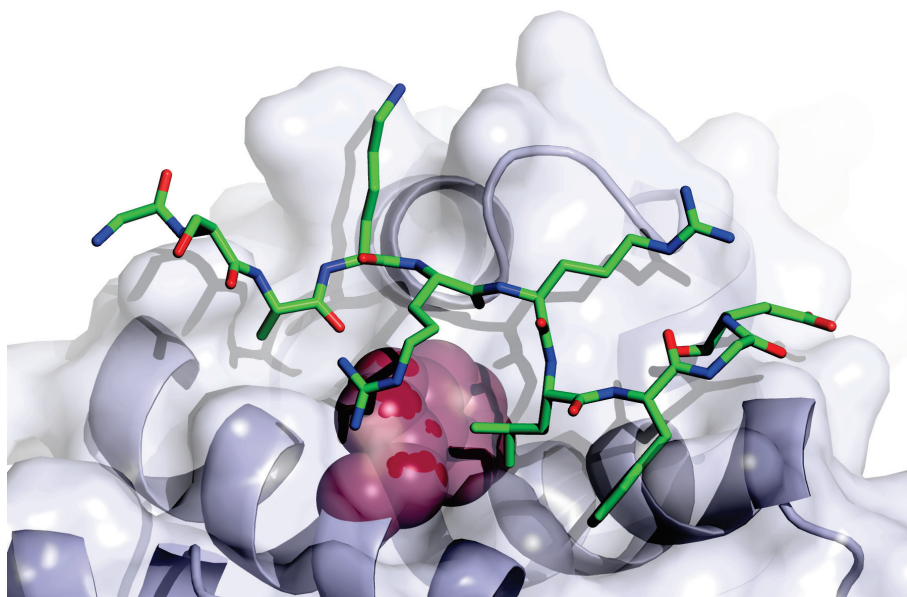


Figura 42. Representación de la interacción entre el péptido GSAKRRLFGE y ciclina A. (PDB 1H28). En morado se representa el residuo de Trp²¹⁷ de ciclina A.

Para mantener en la medida de lo posible las interacciones clave para la formación del complejo péptido-ciclina A, y minimizar las repulsiones que pudiera ocasionar la presencia del complejo de Tb con la proteína, se decidió prescindir del último residuo de Gly⁶⁵⁴ e introducir el ligando quelatante DTPA (ácido dietilentriamino-pentaacético) en el extremo amino terminal del péptido resultante. Asimismo, con el fin de dar mayor flexibilidad a la unión del DTPA con el péptido se optó por mutar la Ser⁶⁵⁵ por una Gly. De esta forma se generarán menos interacciones desfavorables, al tiempo que se mantienen los elementos estructurales característicos para la unión al CBG. La introducción del macrociclo quelatante en esa posición situaría el hipotético complejo con el Tb³⁺ a una distancia aproximada de 14 Å del residuo de Trp sensibilizador. Esta distancia se encuentra dentro del rango para que el proceso de sensibilización se produzca de forma eficiente.

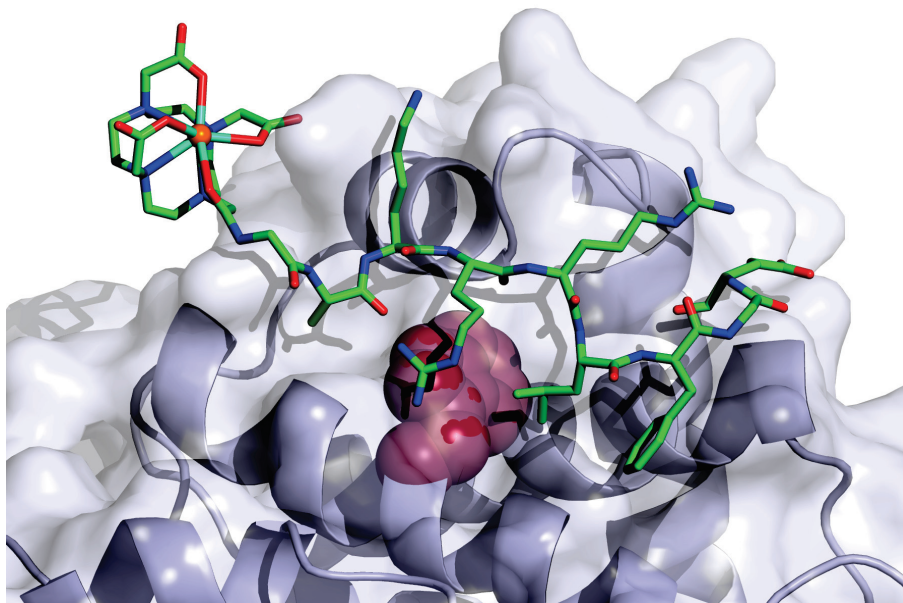
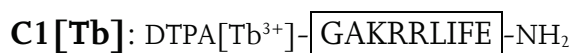


Figura 43. Modelo del complejo formado por la proteína con el péptido que presenta el complejo de terbio en el extremo N-terminal.¹⁰²

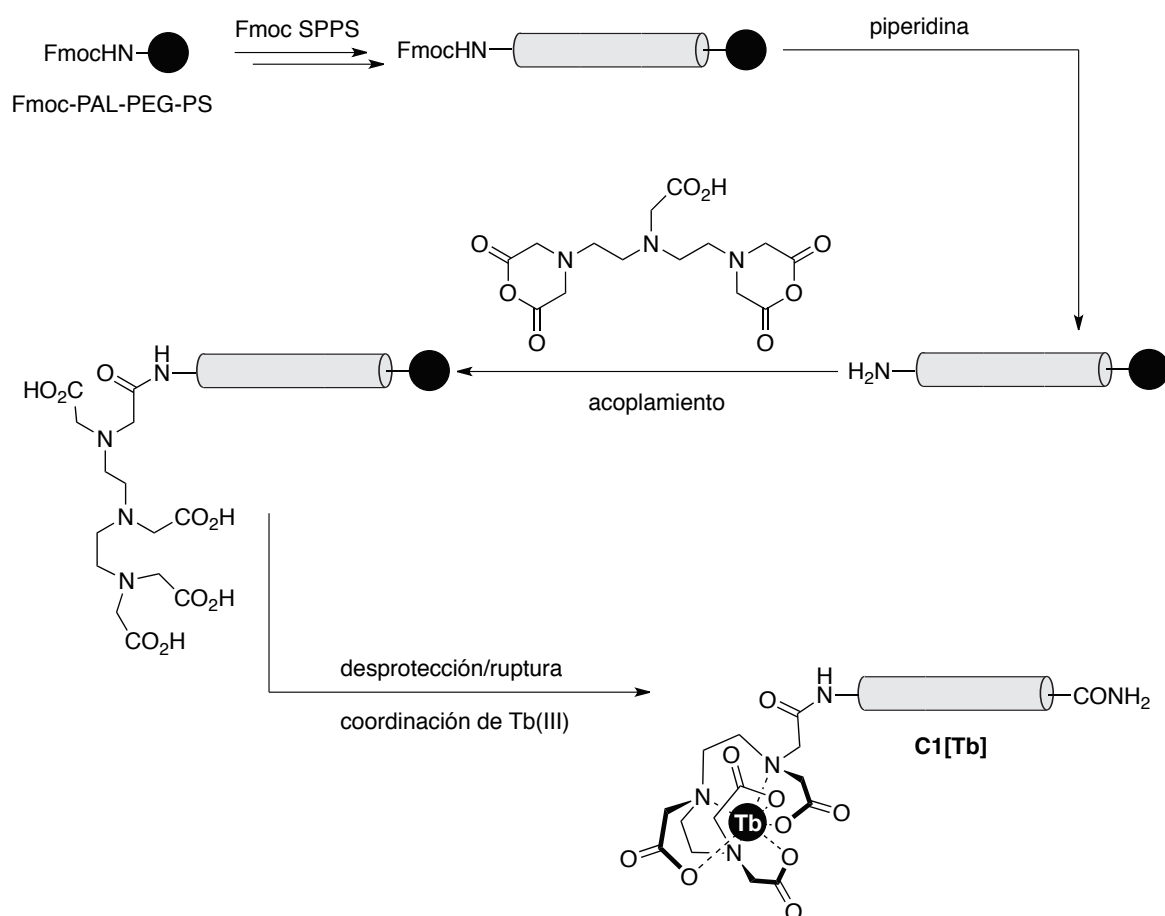
Finalmente se decidió modificar el extremo C-terminal sustituyendo los residuos 661-663 (FGE) por IFE, puesto que se ha demostrado que esta secuencia optimiza las interacciones con el CBG y proporciona péptidos con mayor afinidad por ciclina A.²⁴ Teniendo todo esto en cuenta, hemos diseñado el péptido **C1 [Tb]** como un posible sensor inicial de ciclina A.



102 Estas figuras se realizaron con el programa PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.).

Síntesis del complejo peptídico C1[Tb]

Para la síntesis del péptido **C1[Tb]** se planteó la siguiente estrategia, en la que el complejo quelatante DTPA se acopla en el extremo N-terminal del péptido cuando este está todavía unido al soporte sólido, a través de la reacción con el dianhídrido de ácido de DTPA comercial, tal y como se muestra a continuación.

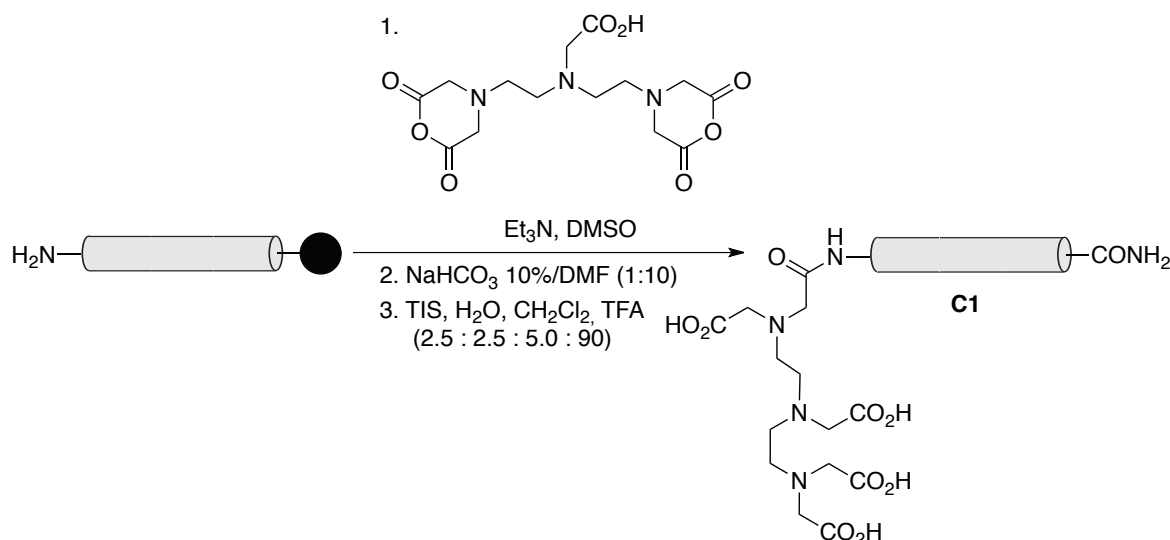


Esquema 9. Planteamiento para la síntesis del sensor de ciclina A **C1[Tb]**.

El péptido GAKRRLIFE se sintetizó siguiendo el protocolo general de síntesis en fase sólida ya descrito y que se detalla en la parte experimental. Todos los acoplamientos se completaron de forma eficiente y no fue necesario en ningún caso volver a reacoplar ningún aminoácido.

El ligando quelatante DTPA se acopla en el extremo N-terminal del péptido una vez se ha desprotegido el grupo Fmoc por tratamiento en las condiciones estándar de 20% piperidina en DMF.

La optimización del acoplamiento en fase sólida utilizando dianhídrido de DTPA (5 eq) y Et₃N (5 eq) como base en DMSO permitió obtener el péptido deseado **C1**, aunque con un rendimiento bajo debido a la formación mayoritaria de un producto secundario proveniente del acoplamiento de dos moléculas de péptido con una de ligando.



Esquema 10. Síntesis del péptido **C1** con el DTPA acoplado en el extremo N-terminal.

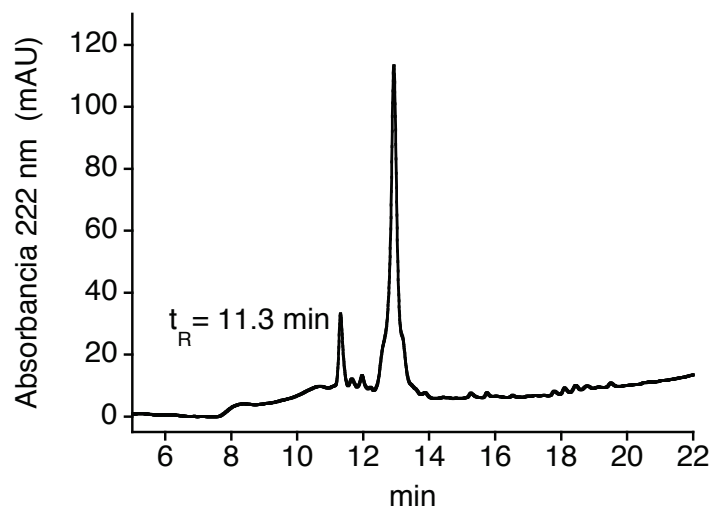
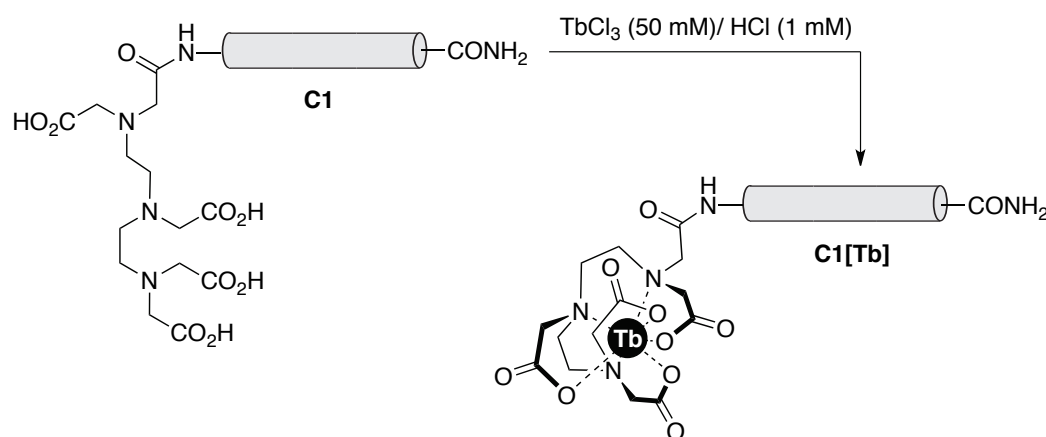


Figura 44. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina después del acoplamiento con el anhídrido de DTPA, en el que el pico de 11.3 min se identificó por MS como el producto deseado **C1** y el pico mayoritario como el producto del acoplamiento de dos moléculas de péptido con una de DTPA.

Aunque el rendimiento obtenido no fue bueno, se procedió a la desprotección y ruptura del péptido de la resina utilizando el procedimiento estándar consistente en el tratamiento de la resina con la mezcla de

desprotección (50 μL CH_2Cl_2 , 25 μL H_2O , 25 μL TIS, 900 μL TFA) y la posterior precipitación del péptido en éter. Finalmente se purificó el producto por HPLC en fase reversa y se liofilizó para la posterior coordinación del metal. El producto **C1** se obtuvo como un sólido blanco con un 6% de rendimiento.

La coordinación del Tb(III) al péptido **C1** se realizó incubando una disolución del péptido en MeOH/ H_2O (2:1) con una disolución de TbCl_3 (50 mM) / HCl (1 mM) y pasando a continuación la mezcla resultante por una columna Lipophilic Sephadex para eliminar el exceso de metal. Las fracciones recogidas se analizaron por ESI-MS.



Esquema 11. Formación del complejo peptídico de terbio **C1[Tb]**.

En los espectros se observan las masas correspondientes tanto al péptido **C1[Tb]** como al péptido **C1** sin Tb(III). Con estos resultados no se pudo concretar si se produce una descoordinación debida al método de ionización utilizado en la espectrometría de masas o si la coordinación del metal al péptido es incompleta.

Posteriormente se decidió utilizar un método simplificado para la formación del complejo,¹⁰³ consistente en añadir a una disolución tamponada del péptido **C1** una disolución de TbCl_3 (50 mM) / HCl (1 mM) y utilizar directamente esa misma disolución sin llevar a cabo la etapa de purificación intermedia.

Con el fin de analizar la coordinación del Tb(III) se decidió sintetizar el péptido **C2** que contiene un residuo de Trp (W), sensibilizador del complejo de terbio, en propia la secuencia para comprobar si se produce o no la coordinación del metal al medir la emisión de luminiscencia.

103 Nitz, M.; Franz, K. J.; Maglathlin, R. L.; Imperiali, B. *ChemBioChem* **2003**, 4, 272.



El péptido se sintetizó en fase sólida siguiendo el mismo procedimiento descrito para **C1**.

Los estudios de emisión de luminiscencia se realizaron sobre una disolución 5 μM del péptido **C2** en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6. En el espectro del péptido solo se observa una banda en torno a 355 nm correspondiente a la banda de emisión del Trp. Cuando se analiza el espectro de emisión de ese péptido en presencia de 10 eq de TbCl_3 se observa la misma banda de emisión del Trp y las tres bandas de emisión características de los complejos de terbio a 488 nm, 545 nm y 585 nm, lo que corrobora que en estas condiciones se forma el complejo metálico deseado **C2[Tb]**.

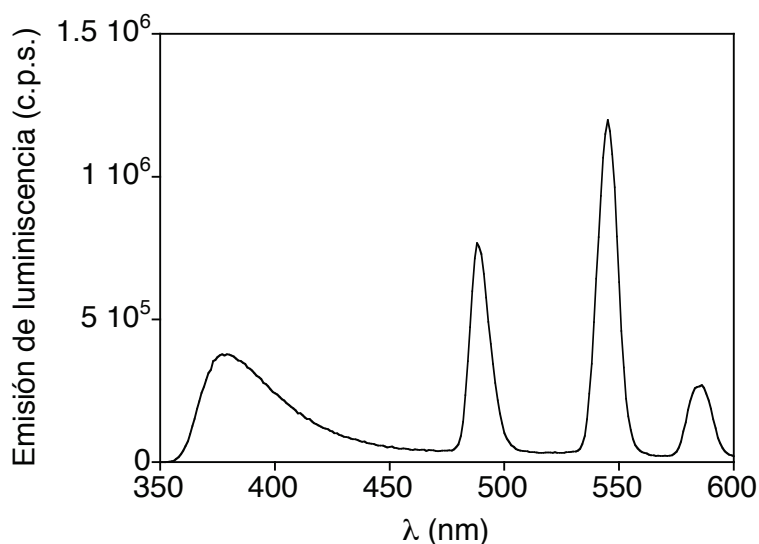


Figura 45. Espectro de luminiscencia del péptido **C2** 5 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, en presencia de 10 eq de TbCl_3 , consistente con la formación de **C2[Tb]**.

Ante estos resultados se decidió realizar los estudios de interacción de **C1** con ciclina A mediante ensayos de luminiscencia sin llevar a cabo ninguna purificación intermedia del supuesto complejo **C1[Tb]**.

Ensayos de luminiscencia con ciclina A

Los ensayos de luminiscencia se llevaron a cabo con la proteína ciclina A proporcionada por el Dr. Anxo Vidal, del Departamento de Fisiología de la USC. Esta proteína se obtuvo mediante expresión en baculovirus, en células de insecto, como proteína de fusión con un Tag de Histidinas y se purificó a través de una columna de Ni^{2+} .

Los ensayos de luminiscencia del péptido **C1[Tb]** se realizaron en ausencia y en presencia de ciclina A, utilizando concentraciones de $2.5 \mu\text{M}$ tanto para el péptido como para la proteína. En la figura 46 se representa el espectro de luminiscencia del péptido coordinado con Tb^{3+} en ausencia y en presencia de ciclina A y el de un blanco de ciclina A añadiendo Tb^{3+} en el medio.

En el espectro del péptido solo no se observa ninguna banda significativa entre 480 y 600 nm. Sin embargo, al añadir ciclina se observa la aparición de las tres bandas características de los complejos de terbio. Este resultado indica que el péptido está interaccionando con ciclina A y que el Tb^{3+} se está sensibilizando de forma efectiva por transferencia de energía desde el residuo de Trp^{217} . Es decir, que el sistema se está comportando tal y como se había diseñado.

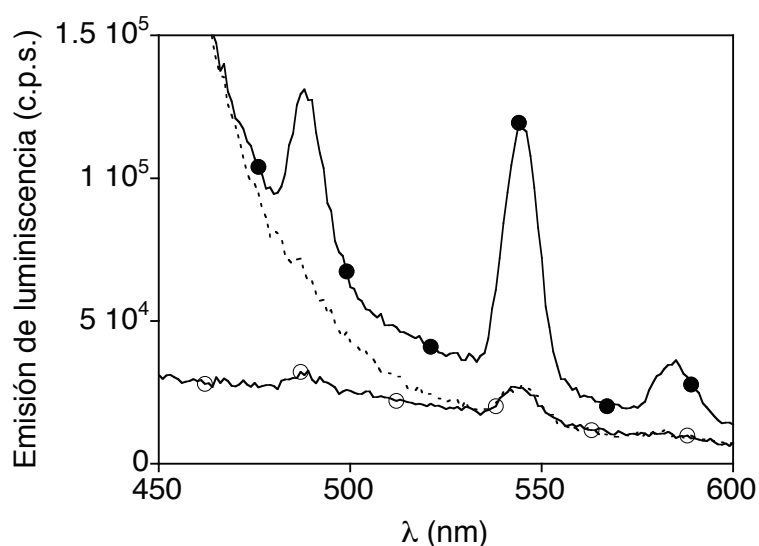


Figura 46. Líneas continuas: (○) espectro de luminiscencia del péptido **C1[Tb]** $2.5 \mu\text{M}$ en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$; (●) muestra anterior en presencia de ciclina A $2.5 \mu\text{M}$. Línea discontinua: ciclina A $2.5 \mu\text{M}$ en presencia de 10 eq de Tb^{3+} . **C1[Tb]** se refiere al resultado de mezclar **C1** con 10 eq de Tb^{3+} (TbCl_3).

En el espectro de ciclina A en presencia de la disolución de Tb^{3+} de la gráfica anterior se observa que hay una pequeña señal en torno a 545 nm que se debe a la coordinación del metal, por parte de la proteína, que está libre en disolución.

En otro ensayo, en presencia de anión fosfato procedente de la disolución de ciclina, se observó que la señal luminiscente característica del Tb desaparecía como consecuencia de la presencia de este ión en el medio debido a que el fosfato secuestraba al metal del complejo peptídico de DTPA. Para solucionar estos inconvenientes se decidió cambiar el ligando quelatante DTPA por el ligando macrocíclico DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético). Este agente quelatante, al ser un ligando cíclico, forma complejos metálicos más estables termodinámicamente que los formados por los ligandos abiertos como el DTPA. Esta mayor estabilidad podría permitir que los complejos metálicos formados puedan ser aislados y purificados, eliminando así el metal libre en disolución en los ensayos de luminiscencia del sensor con ciclina A y asegurando la estabilidad de los complejos en medios coordinantes competitivos como es la presencia del ión fosfato.

Diseño de sensores de ciclina A basados en complejos macrocíclicos de Tb(III)

El diseño de estos sensores se hizo partiendo de la estructura de **C1[Tb]**, sustituyendo el ligando DTPA por el DOTA, lo que genera el péptido **C3[Tb]**. Además, con el fin de optimizar el sensor y estudiar la influencia de la posición relativa del ión respecto al Trp²¹⁷, se decidió sintetizar el péptido **C4[Tb]**, en el que la unidad quelatante DOTA está unida a la cadena lateral de Lys orientada hacia afuera del surco de la proteína y el péptido **C5[Tb]**, que presenta el DOTA unido a la cadena lateral más corta del ácido 2,3-diaminopropanoico (Dap) en la misma posición. También se decidió sintetizar el péptido control **C6** (octapéptido derivado del extremo C-terminal del inhibidor de ciclina A p21)²⁴ que presenta gran afinidad por ciclina y carece del ligando quelatante DOTA.

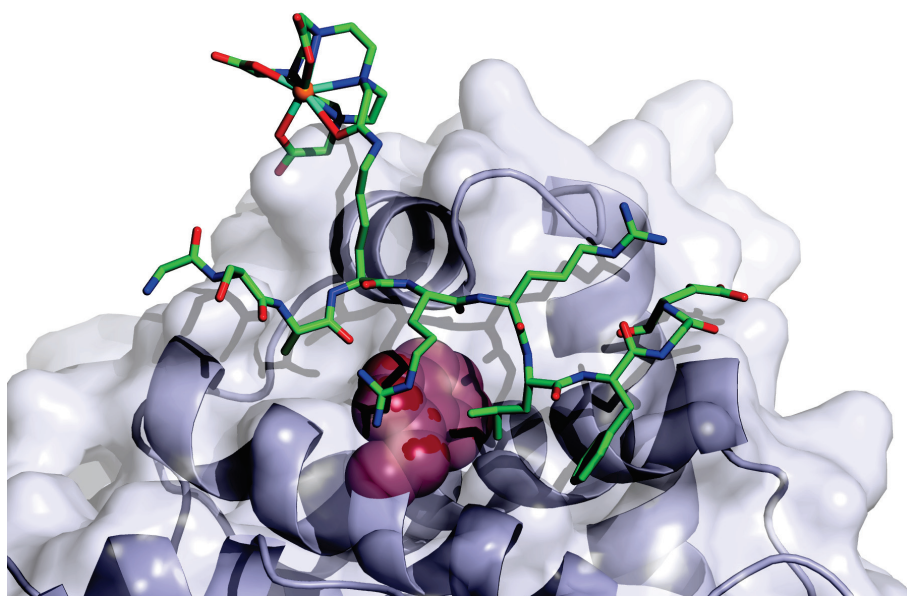
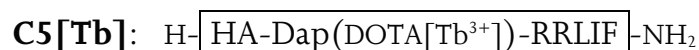
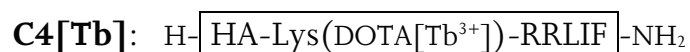
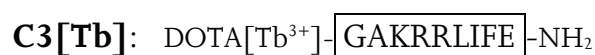


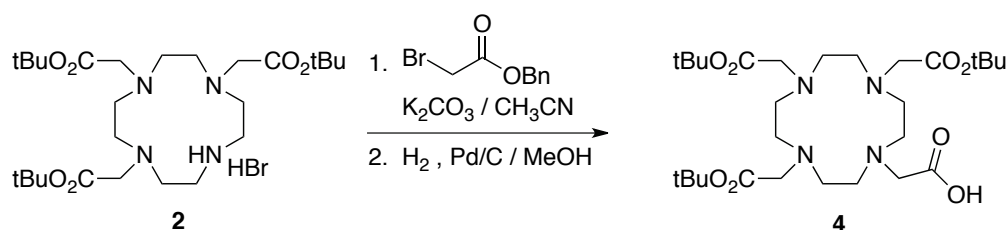
Figura 47. Modelo de la proteína con el péptido que presenta el complejo de terbio acoplado en la cadena lateral de la Lys (**C4[Tb]**).

Síntesis de los péptidos modificados con el ligando macrocíclico

Síntesis del DOTA tris(*t*-Bu) éster

Se planteó la síntesis del ligando DOTA tris(*t*-Bu) éster (**4**) convenientemente protegido para su introducción en los péptidos en fase sólida a través de un grupo ácido siguiendo procedimientos anteriormente descritos con pequeñas modificaciones.¹⁰⁴

Por lo tanto, se partió del hidrobromuro de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (**2**) que se alquiló con bromoacetato de bencilo en presencia de K₂CO₃ anhidro. La reacción se llevó a cabo en acetonitrilo a reflujo. A continuación se eliminó el exceso de K₂CO₃ mediante filtración y se realizó una posterior purificación en columna cromatográfica. Este producto se hidrogenó en presencia de Pd/C y la posterior filtración sobre celita dio lugar al producto deseado **4** con un rendimiento del 47%.



Esquema 12. Síntesis del ligando **4** a partir del hidrobromuro de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (**2**).

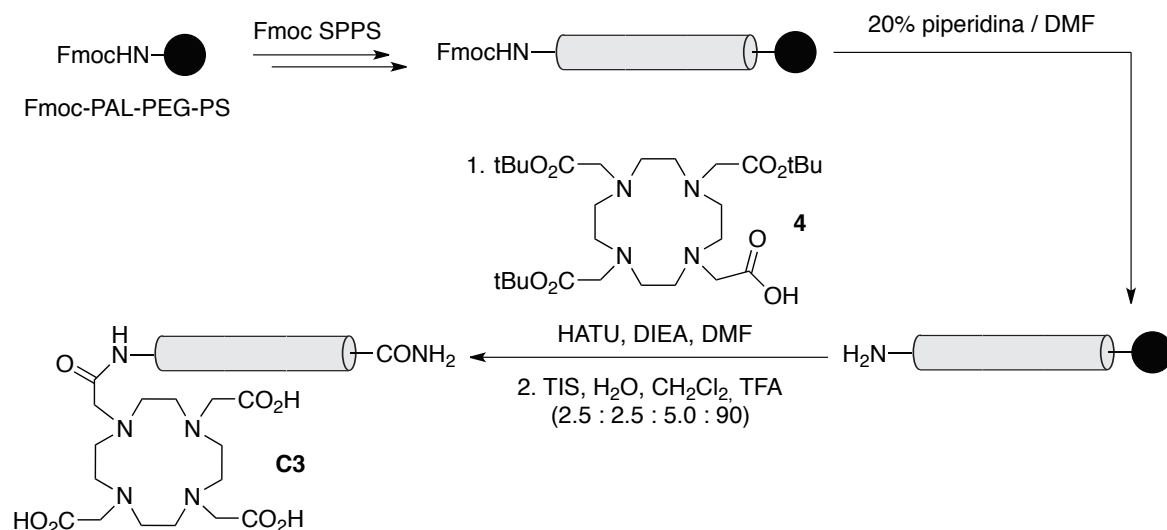
Síntesis de los péptidos

Para la síntesis del péptido **C3[Tb]**, que contiene el DOTA en el extremo N-terminal, se sintetizó el núcleo peptídico en fase sólida siguiendo los procedimientos Fmoc estándar ya descritos.

Una vez sintetizado el péptido se procedió a la desprotección del extremo amino-terminal utilizando 20% piperidina en DMF. El derivado del DOTA **4** se acopló utilizando HATU, como agente de acoplamiento, en presencia de DIEA

104 Aarons, R. J.; Notta, J. K.; Meloni, M. M.; Feng, J.; Vidyasagar, R.; Narvainen, J.; Allan, S.; Spencer, N.; Kauppinen, R. A.; Snaith, J. S.; Faulkner, S. *Chem. Commun.* **2006**, 909.

en DMF. El análisis de la reacción por HPLC-MS mostró un pico con un tiempo de retención de 13.8 min cuya masa correspondía a la del producto deseado y otros picos, entre ellos el mayoritario, que no pudieron ser identificados.



Esquema 13. Síntesis del péptido **C3** con la unidad quelatante DOTA en el extremo N-terminal.

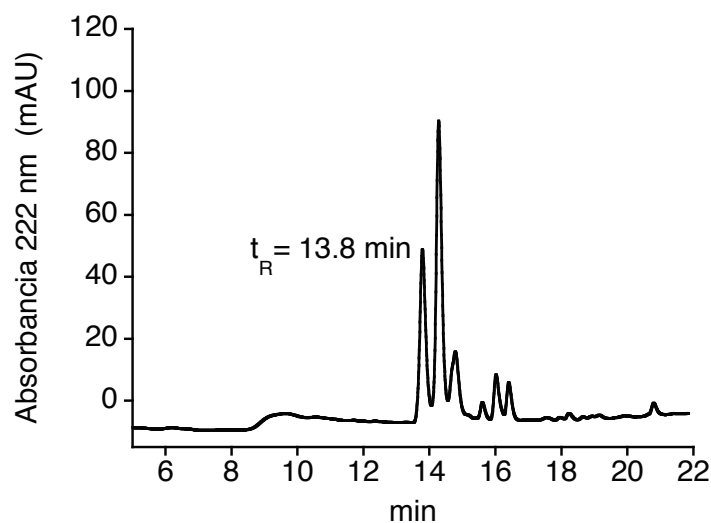
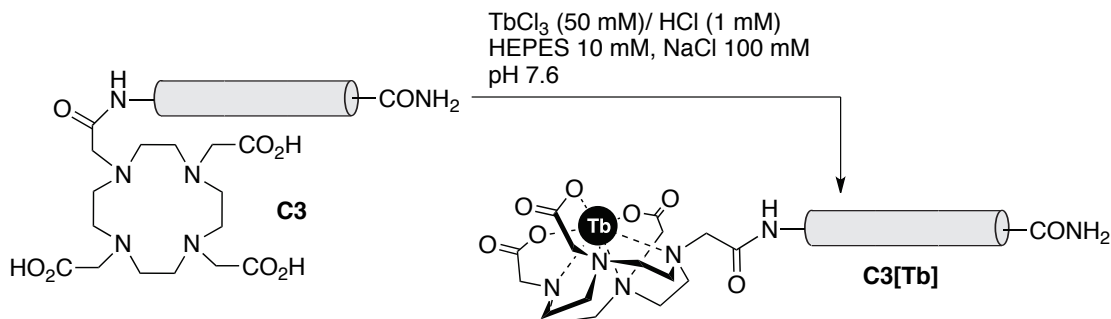


Figura 48. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 13.8 min corresponde al péptido **C3** según se pudo comprobar por MS.

Una vez realizado el acoplamiento se procedió a la fase de desprotección y ruptura de la resina utilizando el procedimiento estándar, consistente en un tratamiento con la mezcla de desprotección con atrapadores de cationes (50 μ L CH₂Cl₂, 25 μ L H₂O, 25 μ L TIS, 900 μ L TFA) y la posterior precipitación en éter. El residuo se purificó por HPLC en fase reversa para dar el péptido deseado **C3**.

El péptido liofilizado se redisolvió en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6 y se trató con una disolución de TbCl₃ (50 mM) / HCl (1 mM) para formar el complejo metálico.



Esquema 14. Formación del complejo peptídico de terbio **C3[Tb]**.

El crudo de reacción se analizó mediante HPLC-MS y se observó un único pico correspondiente al complejo peptídico de terbio que fue posteriormente purificado mediante HPLC en fase reversa. El péptido **C3[Tb]** se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento global del 13% para toda la síntesis.

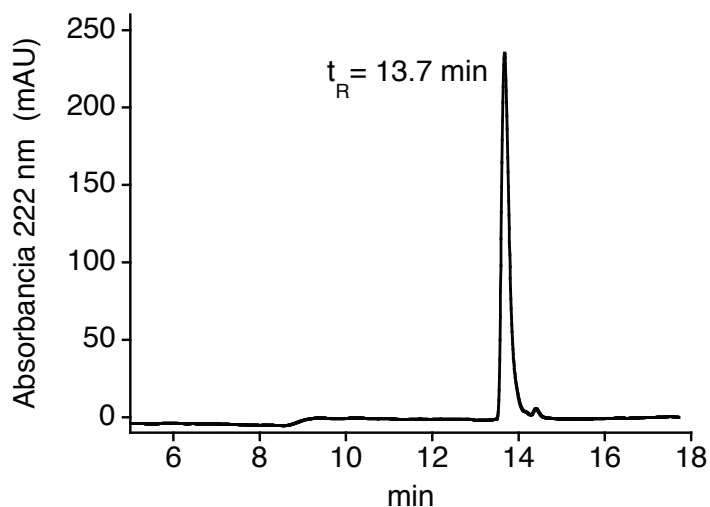
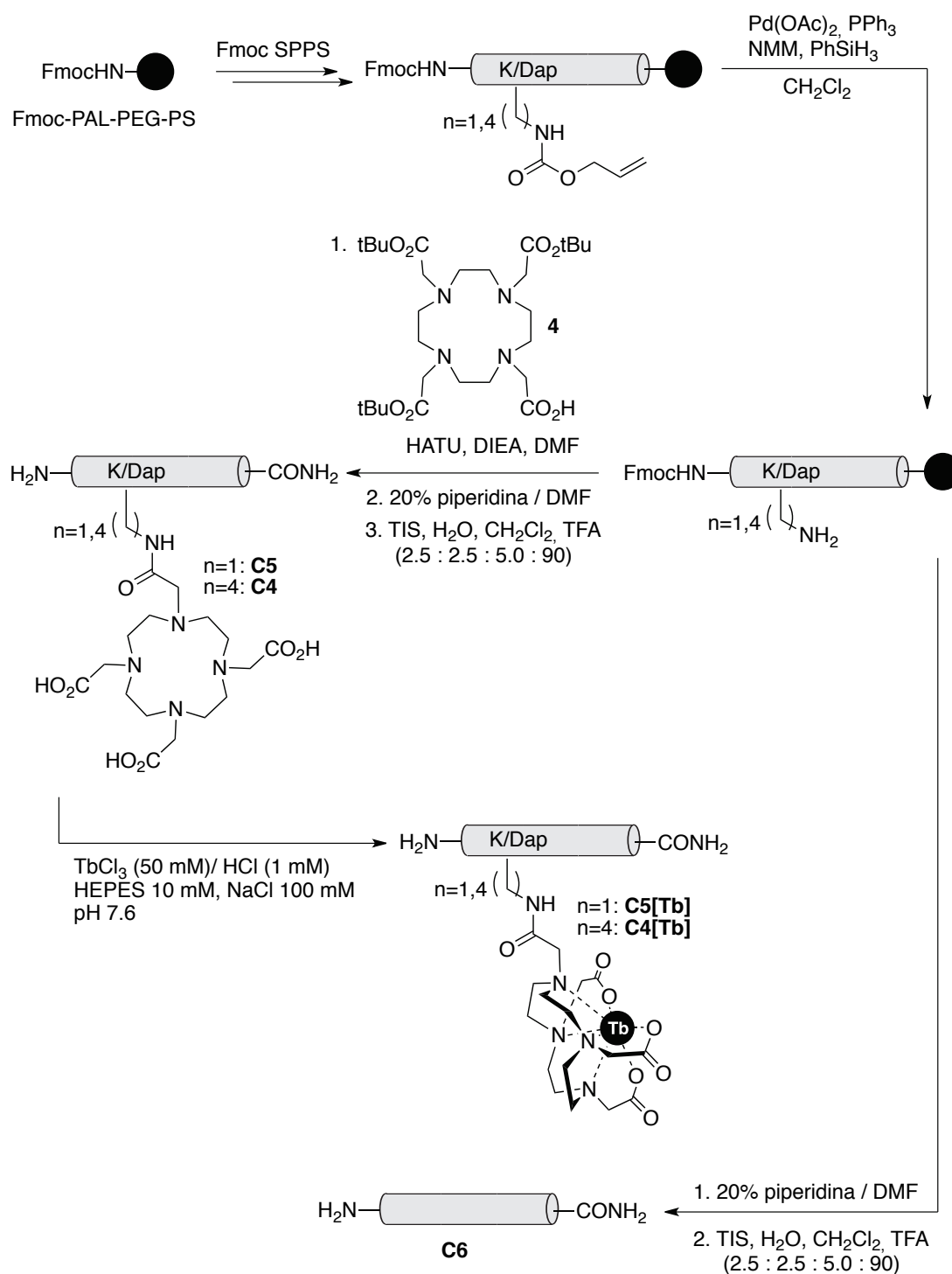


Figura 49. Cromatograma de HPLC del crudo de reacción en el que el pico de 13.7 min corresponde al producto deseado **C3[Tb]**.

Es destacable que, al contrario de lo que ocurre con el péptido **C1** que contiene el ligando DTPA, la presencia del ligando macrocíclico DOTA permite obtener el complejo metálico después de la purificación por HPLC.

Los péptidos **C4[Tb]** y **C5[Tb]** se sintetizaron siguiendo el esquema de reacciones especificado a continuación.



Esquema 15. Procedimiento para la síntesis de los complejos peptídicos de terbio **C4[Tb]** y **C5[Tb]** con la unidad de DOTA acoplada en las cadenas laterales de Lys o Dap y del péptido **C6**.

En el caso del proceso para la obtención de **C5**, el residuo de Dap se introdujo en el péptido con su cadena lateral protegida por un grupo alloc que permite su eliminación ortogonal mediante catálisis con Pd y la conjugación selectiva del DOTA en dicha posición.

La eliminación del grupo alloc se llevó a cabo con Pd(OAc)₂, PPh₃, PhSiH₃ y NMM en CH₂Cl₂. A continuación, se acopló el ligando quelatante **4**, mientras el péptido todavía está unido a la resina, utilizando HATU como agente de acoplamiento en presencia de DIEA en DMF. Una vez realizado el acoplamiento la reacción se analizó por HPLC-MS, obteniéndose el cromatograma que se muestra en la figura siguiente en el que se observó un pico correspondiente al producto deseado **C5** con el extremo N-terminal protegido con el grupo Fmoc.

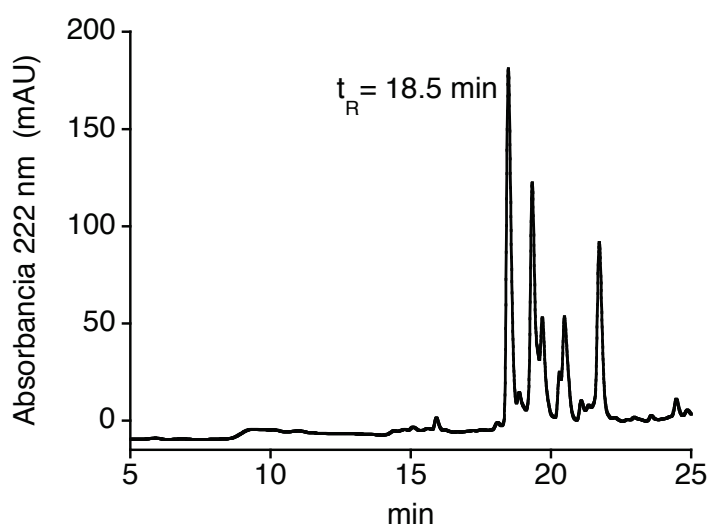


Figura 50. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina después de la reacción con el ligando **4**, en el que el pico mayoritario de 18.5 min corresponde al producto deseado **C5** con el extremo N-terminal protegido.

A continuación se eliminó el grupo Fmoc del extremo N-terminal en fase sólida y se procedió a la desprotección y ruptura del péptido de la resina siguiendo los procedimientos ya detallados previamente. Se precipitó el péptido en éter y se purificó por HPLC en fase reversa. Una vez liofilizado se redisolvió y se ensayó la formación del complejo de Tb³⁺ siguiendo las condiciones descritas con anterioridad. El crudo de reacción se analizó mediante HPLC-MS y se obtuvo el cromatograma que se muestra a continuación, en el que se observó un único pico correspondiente al complejo peptídico de terbio **C5[Tb]** que se purificó mediante HPLC en fase reversa. El

péptido **C5[Tb]** se aisló como un sólido blanco con un rendimiento global del 15% para toda la síntesis.

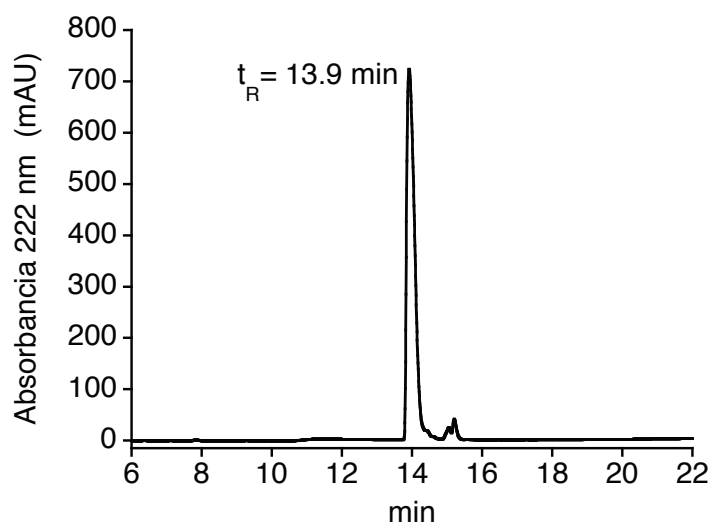


Figura 51. Cromatograma de HPLC del crudo de reacción en el que el pico de 13.9 min corresponde al producto deseado **C5[Tb]**.

Para la obtención del péptido **C4[Tb]**, en el que el complejo DOTA-[Tb³⁺] se introduce en la cadena lateral de Lys, se siguieron procedimientos análogos a los descritos para el péptido **C5[Tb]**, aislándose también como un sólido blanco con un 17% de rendimiento total.

Ensayos de luminiscencia

Ensayos de interacción de los péptidos con ciclina A

Los ensayos de luminiscencia se llevaron a cabo con la proteína ciclina A proporcionada por el Dr. Anxo Vidal. En este caso, la ciclina fue expresada en plásmidos recombinantes en bacterias como proteína de fusión con un Tag de histidinas y purificada a través de una columna de Ni^{2+} .

Se realizaron los ensayos de luminiscencia de los péptidos en ausencia y en presencia de ciclina A para estudiar los cambios inducidos en los espectros de emisión como consecuencia del reconocimiento de la proteína. Los estudios de emisión de luminiscencia se realizaron sobre una disolución $1 \mu\text{M}$ de los péptidos en HEPES 10 mM , NaCl 100 mM , $\text{pH} = 7.6$, a los que se añadieron alícuotas de $1 \mu\text{L}$ de una madre de ciclina A $37 \mu\text{M}$.

En ausencia de ciclina el espectro de emisión de **C3[Tb]** ($1 \mu\text{M}$) no presenta ninguna banda significativa entre 480 y 600 nm , sin embargo, al añadir ciclina A sobre esta disolución se observa la aparición de las tres bandas características de los complejos de Tb^{3+} . Este resultado sugiere que el péptido está interaccionando con ciclina A y que, como se esperaba, la formación del complejo entre el péptido y la proteína sitúa el centro metálico a una distancia inferior a 20 \AA permitiendo la transferencia de energía entre Trp^{217} y el Tb^{3+} .

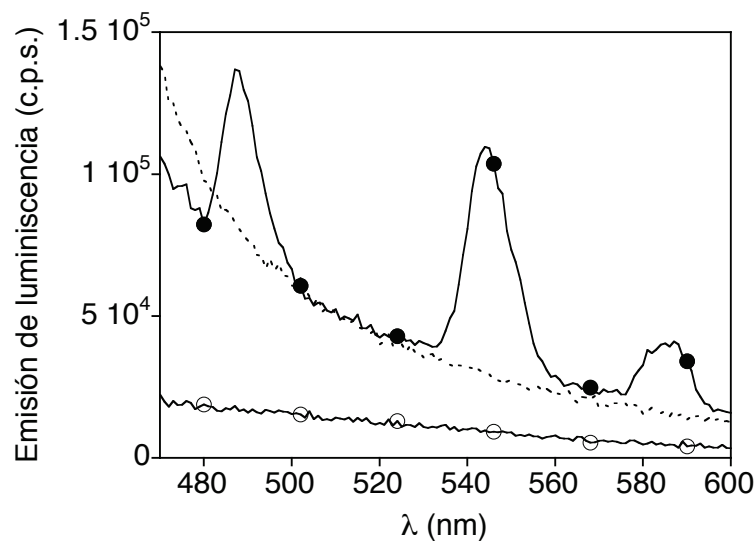


Figura 52. Líneas continuas: (○) espectro de luminiscencia del complejo peptídico de terbio **C3[Tb]** $1 \mu\text{M}$ en HEPES 10 mM , NaCl 100 mM , $\text{pH} = 7.6$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$; (●) misma muestra en presencia de ciclina A $5 \mu\text{M}$. Línea discontinua: blanco de ciclina A.

El siguiente espectro que se muestra corresponde al espectro de luminiscencia del péptido **C4[Tb]**, en el que el DOTA está unido al péptido a través de la cadena lateral de la Lys, en ausencia y en presencia de ciclina A 5 μM , junto con un blanco de ciclina.

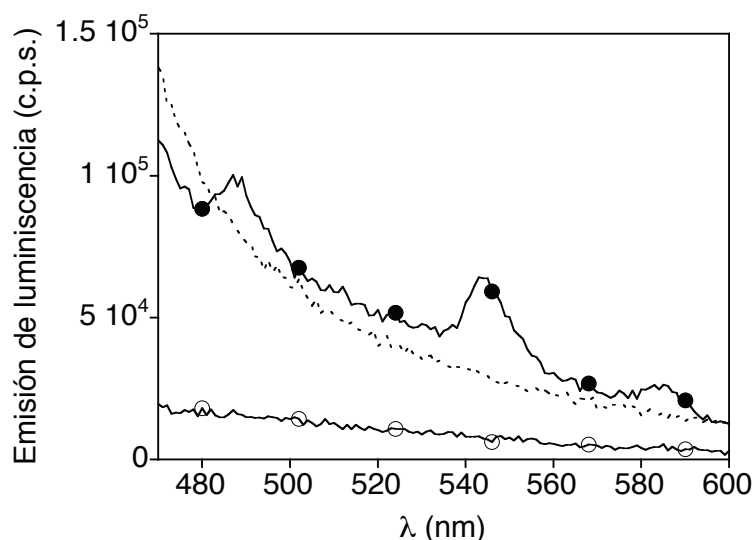


Figura 53. Líneas continuas: (\circ) espectro de luminiscencia del complejo peptídico de terbio **C4[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm; (\bullet) misma muestra en presencia de ciclina A 5 μM . Línea discontinua: blanco de ciclina A.

Al igual que en el caso del péptido **C3[Tb]**, el espectro de luminiscencia del péptido **C4[Tb]** en ausencia de ciclina no presenta ninguna banda de emisión entre 480 y 600 nm; al añadir ciclina A sobre esta disolución se observa de nuevo la aparición de las tres bandas características de los complejos de Tb^{3+} . Este resultado indica que el péptido está interaccionando con ciclina A, de tal modo que el complejo de terbio se encuentra a una distancia inferior a 20 Å del Trp^{217} permitiendo así la transferencia de energía entre la antena y el complejo de terbio. Sin embargo, si se compara este espectro con el del péptido **C3[Tb]**, se observa que la intensidad de las bandas para el péptido **C4[Tb]** es menor. Este resultado sugiere que la distancia entre el ión y el Trp^{217} es mayor en el caso del péptido **C4[Tb]** que en el del péptido **C3[Tb]** lo cual determina una menor eficiencia en la transferencia de la excitación y una menor emisión por parte del centro metálico, aunque también podría explicarse en términos de una menor constante de asociación.

El siguiente espectro corresponde al espectro de luminiscencia del péptido **C5[Tb]**, en el que la unidad quelatante DOTA se encuentra unido al ácido

2,3-diaminopropanoico a través de la cadena lateral de tipo amina, en ausencia y en presencia de ciclina 5 μM , junto con el blanco de ciclina.

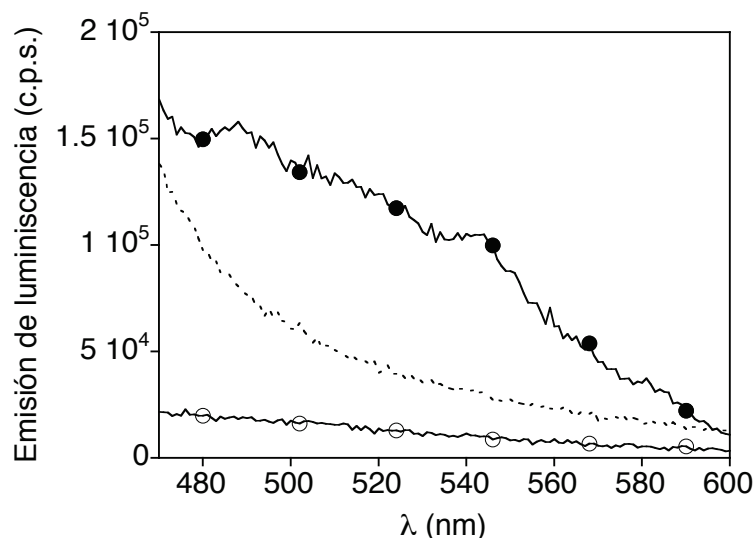


Figura 54. Líneas continuas: (○) espectro de luminiscencia del complejo peptídico de terbio **C5[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm; (●) misma muestra en presencia de ciclina A 5 μM . Línea discontinua: blanco de ciclina A.

En el espectro del péptido solo, al igual que en los casos anteriores, no se observa ninguna banda significativa entre 480 y 600 nm. Sin embargo, a diferencia de lo que se observaba con los péptidos **C3[Tb]** y **C4[Tb]**, en este caso al añadir ciclina A no se observa la aparición de las tres bandas características. El modelo estructural sugiere que en este caso el DOTA[Tb³⁺] se encuentra unido a través de una cadena lateral demasiado corta que impide la inserción del péptido en el surco de reconocimiento de la ciclina A, por lo que no llega a formarse el complejo necesario para que tenga lugar la transferencia de energía.

Viendo que el péptido **C3[Tb]** es el que presenta mejores propiedades de emisión, se decidió caracterizar más en profundidad su interacción con ciclina A. Para ello se realizó una valoración añadiendo alícuotas de 1 μL de una madre de ciclina A (37 μM) sobre una disolución 1 μM del péptido **C3[Tb]**, que se muestra a continuación.

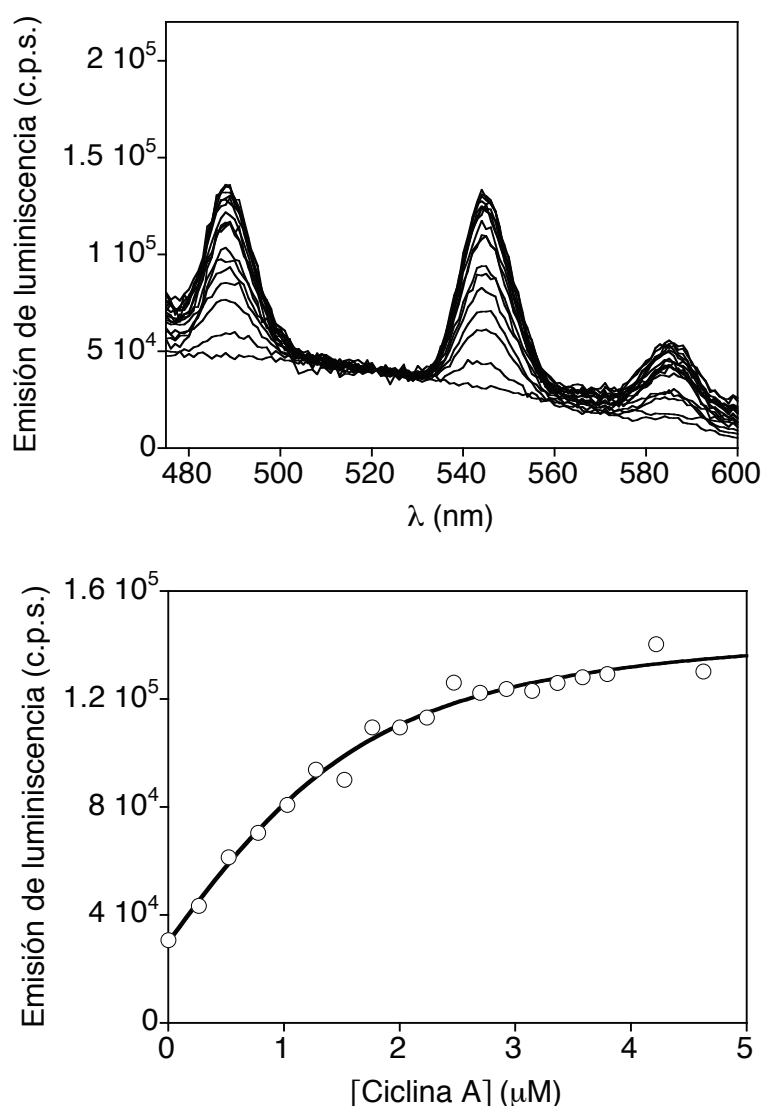


Figura 55. Arriba. Valoración luminiscente de **C3[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, añadiendo alícuotas de 1 μL de una madre de ciclina A 37 μM . **Abajo.** La gráfica representa el aumento de la señal de emisión de **C3[Tb]** a 545 nm frente a la concentración de ciclina A añadida.

El aumento en la señal de luminiscencia a 545 nm presenta el típico perfil de saturación que permitió calcular la constante de disociación $K_D \approx 895$ nM (figura 55, abajo). El ajuste para el cálculo de la constante se llevó a cabo considerando un modelo de interacción 1:1 que matemáticamente se representa mediante la siguiente ecuación:¹⁰⁵

$$F_T = \frac{1}{2} \left(2F_0 + F_{RL} \times \left[K_D + L_T + R_T - \sqrt{(K_D + L_T + R_T)^2 - 4L_T R_T} \right] \right)$$

105 Thordarson, P. Chem. Soc. Rev. **2011**, 40, 1305.

R_T es la concentración total de receptor (ciclina A); L_T es la concentración total del ligando marcado (**C3[Tb]**); K_D es la constante de disociación de la interacción entre el receptor y el ligando; F_T es la emisión total observada; F_0 es un parámetro ajustable para contabilizar la emisión de fondo; F_{RL} es un parámetro ajustable para la emisión molar del complejo marcado ligando-receptor.

Con el fin de comprobar el modelo de interacción propuesto, se llevó a cabo un ensayo de desplazamiento. Para ello se añadieron alícuotas de $0.2 \mu\text{L}$ de una madre $70 \mu\text{M}$ del péptido control **C6** sobre la mezcla del péptido **C3[Tb]** y ciclina A. Tal y como se esperaba, el péptido **C6** compite con el péptido **C3[Tb]** por la unión a ciclina A, de manera que el aumento en la concentración de **C6** produce el desplazamiento progresivo del péptido **C3[Tb]** y la disminución en la señal de emisión de luminiscencia.

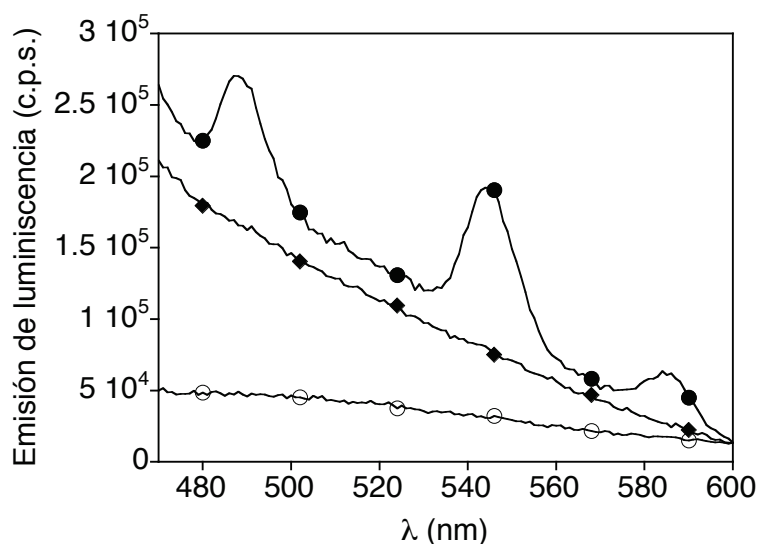


Figura 56. (○) Espectro de luminiscencia del complejo peptídico de terbio **C3[Tb]** $1 \mu\text{M}$ en HEPES 10 mM , NaCl 100 mM , $\text{pH} = 7.6$, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$; (●) misma muestra en presencia de ciclina A $5 \mu\text{M}$; (◆) muestra anterior después de la adición de **C6** $2.6 \mu\text{M}$ sobre el complejo péptido-ciclina, que desplaza a **C3[Tb]** del CBG.

Ensayos de selectividad

Para comprobar la especificidad del péptido **C3[Tb]** por ciclina A se realizaron ensayos de luminiscencia del péptido **C3[Tb]** en presencia de otras proteínas como seroalbúmina bovina (BSA), inmunoglobulina G (IgG) o proteína básica de la mielina (MBP). Como se esperaba, ninguna de las tres proteínas fueron capaces de sensibilizar al metal.

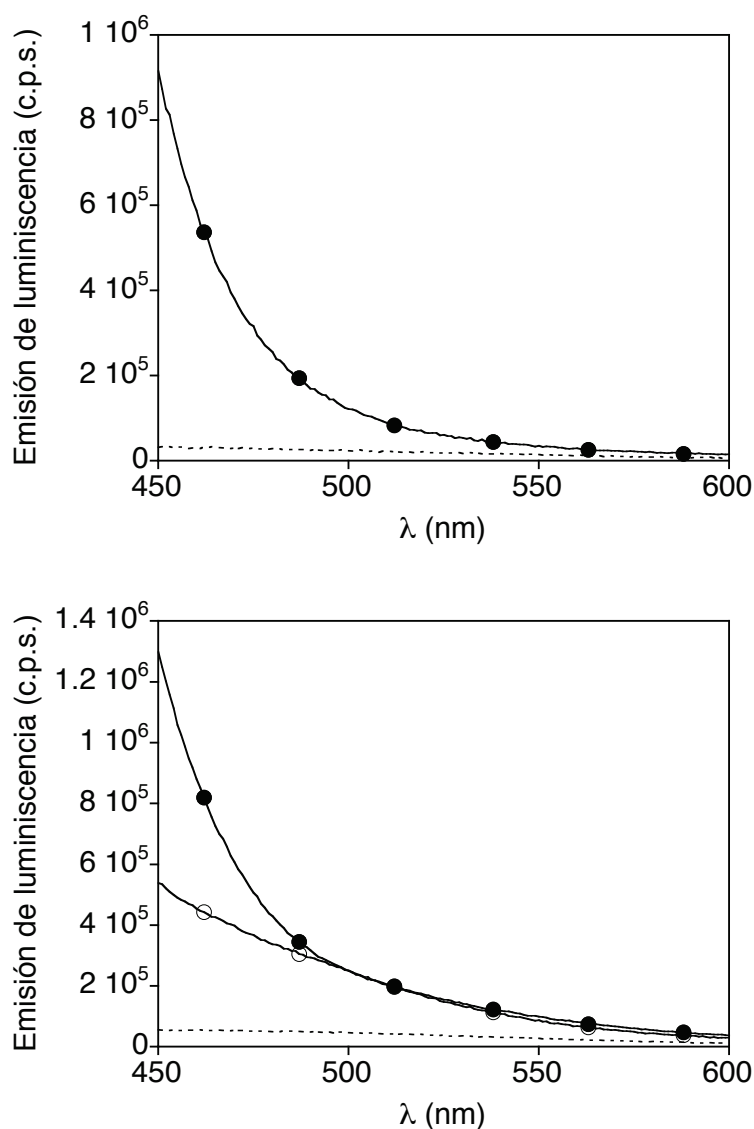


Figura 57. Arriba. Línea discontinua: espectro del péptido **C3[Tb]** 1 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, λ_{exc} = 280 nm. Línea continua: (●) misma muestra en presencia de BSA 12.5 μ M (contiene 3 Trp en su secuencia). **Abajo.** Línea discontinua: espectro del péptido **C3[Tb]** 1 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6. Líneas continuas: (●) misma muestra después de la adición de 820 μ g/mL de MBP (contiene 2 Trp en su secuencia); (○) espectro de **C3[Tb]** después de la adición de 830 μ g/mL de IgG (contiene 26 Trp en su secuencia).

Finalmente, para probar el sistema en condiciones biológicas relevantes, se medió la emisión del péptido **C3[Tb]** con cantidades crecientes de ciclina A en presencia de un medio complejo como es un lisado celular (concentración de proteína total de 290 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El péptido **C3[Tb]** mostró una extraordinaria especificidad y no se observó emisión alguna hasta que se añadió la ciclina A a la disolución. La emisión total se vio ligeramente disminuida en estas condiciones con respecto a lo observado cuando solo hay ciclina A y se pudo calcular un límite de detección de ciclina A de aproximadamente 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

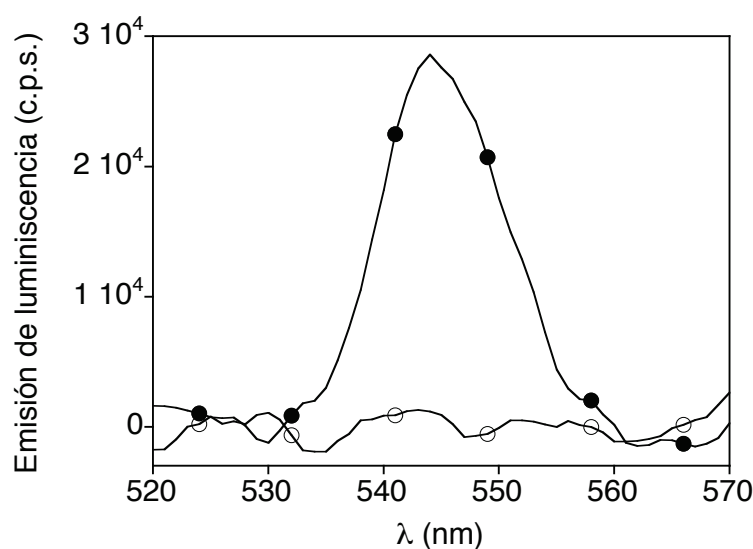


Figura 58. (○) Espectro de luminiscencia del complejo peptídico de terbio **C3[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, $\text{pH} = 7.6$ y 290 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total de lisados celulares, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$. (●) misma muestra después de la adición de 3 μL de una disolución madre de ciclina A 37 μM , que es la cantidad mínima de ciclina A añadida que provoca una señal luminiscente clara por parte del metal (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Conclusiones

Se han desarrollado **sensores de ciclina A** basados en secuencias peptídicas que se unen al surco de reconocimiento de los sustratos de ciclina A (CBG) y que incorporan dos tipos de complejos de lantánidos luminiscentes, DTPA-[Tb³⁺] o DOTA-[Tb³⁺], situados en el extremo N-terminal de la secuencia peptídica.

Se ha demostrado que el péptido **C3[Tb]** presenta una constante de unión a ciclina de ≈ 895 nM. Mediante esta estrategia se han podido detectar niveles de ciclina en torno a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medios biológicos complejos como son los lisados celulares, lo que constituye una prueba significativa de la selectividad de esta aproximación al diseño de sensores biológicos.

También se ha demostrado que la estrategia de transferencia de excitación intermolecular desde la cadena lateral del residuo de Trp presente en ciclina A al Tb(III) es efectiva, siendo este el primer ejemplo de un sensor luminiscente de Ln(III) basado en la transferencia intermolecular que permite detectar una proteína de relevancia biológica.¹⁰⁶

106 Los resultados de este trabajo han sido publicados en: Pazos, E.; Torrecilla, D.; Vázquez López, M.; Castedo, L.; Mascareñas, J. L.; Vidal, A.; Vázquez, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9652 y han sido objetivo de una solicitud de patente: Pazos, E.; Vidal, A.; Mascareñas, J. L.; Vázquez, M. E. Sensor fluorescente y su uso para la detección de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas y/o para la detección de ciclinas. Patente ES 2 331 286 B2, 2010.

Sensores solvatocrómicos de ciclina A

Diseño de sensores de ciclina A basados en fluoróforos solvatocrómicos

El diseño de sensores basados en fluoróforos solvatocrómicos es muy interesante ya que el cambio en sus propiedades de emisión en función del entorno que los rodea permite obtener información de las características fisicoquímicas en las proximidades del fluoróforo.

El diseño de estas sondas, al igual que en el caso de los sensores de ciclina basados en complejos de lantánidos, se basa en la información estructural disponible de inhibidores de ciclina A unidos al surco de reconocimiento de los sustratos de la proteína (CBG). Para ello se utilizó como punto de partida la estructura del complejo de ciclina A con el fragmento peptídico 654-663 (GSAKRRLFGE) del inhibidor natural p107.¹⁰¹

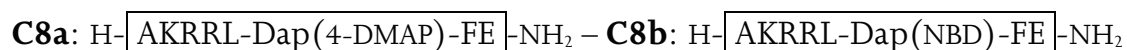
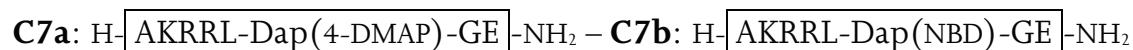
Como ya se ha comentado, la estabilización de dicho complejo se debe a los contactos que se establecen entre el surco hidrofóbico de Ciclina y las cadenas laterales de ciertos aminoácidos del péptido como Arg⁶⁵⁸, Leu⁶⁶⁰ y Phe⁶⁶¹. En cambio, las cadenas laterales de determinados residuos como Arg⁶⁵⁹ se proyectan fuera del surco de unión, por lo que son menos importantes para la unión de alta afinidad.

Los estudios realizados con diferentes bibliotecas de péptidos han permitido identificar cinco residuos claves para la unión a ciclina A,^{24, 107} que se corresponden con los aminoácidos 658-662 del fragmento indicado anteriormente, y definir la secuencia consenso **RxLhh'** que se conoce como **patrón de unión a ciclina**, donde **x** es un residuo básico y **h** y **h'** son residuos hidrofóbicos como Ile o Phe.

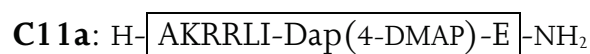
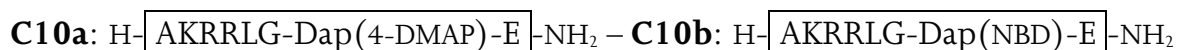
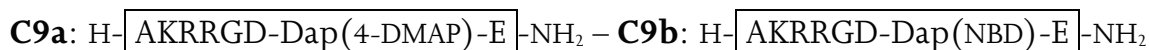
Sobre esta base, se han diseñado diferentes péptidos que incorporan los fluoróforos sensibles a la polaridad 4-DMAP (serie **a**) y NBD (serie **b**) en distintas posiciones de las secuencias. (Estructuras en figura 17, página 33).

Los péptidos **C7** y **C8** incluyen los residuos fluorogénicos en la posición 4 (**h**) de la secuencia consenso, de la que se sabe que actúa como conector entre los residuos hidrofóbicos que la flanquean.

107 a) Chen, J.; Saha, P.; Kombluth, S.; Dynlacht, B. D.; Dutta, A. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 4673. b) Adams, P. D.; Sellers, W. R.; Sharma, S. K.; Wu, A. D.; Nalin, C. M.; Kaelin Jr, W. G. *Mol. Cell Biol.* **1996**, 16, 6623.



En los péptidos **C9**, **C10** y **C11** el residuo fluorogénico sustituye a la Phe de la posición 5 (**h'**), que establece contactos hidrofóbicos con el fondo del surco de ciclina (CBG), e incorporan Ile (**C11**), un residuo flexible de Gly (**C10**) o un residuo polar de Asp (**C9**) en la posición 4 que actúa de conector.



Finalmente, se incorpora el fluoróforo 4-DMAP en el extremo N-terminal de la secuencia optimizada del patrón de unión a ciclina, tanto a través de la cadena lateral de un residuo de Dap (**C12a**) como unida directamente a la amina N-terminal del residuo de Gly (**C13a**).

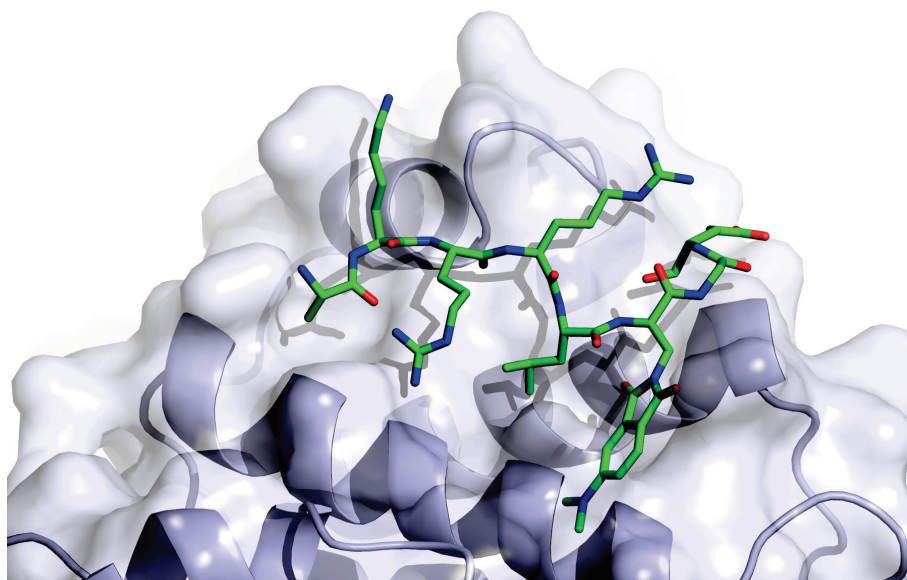
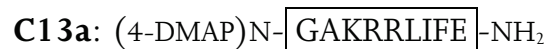
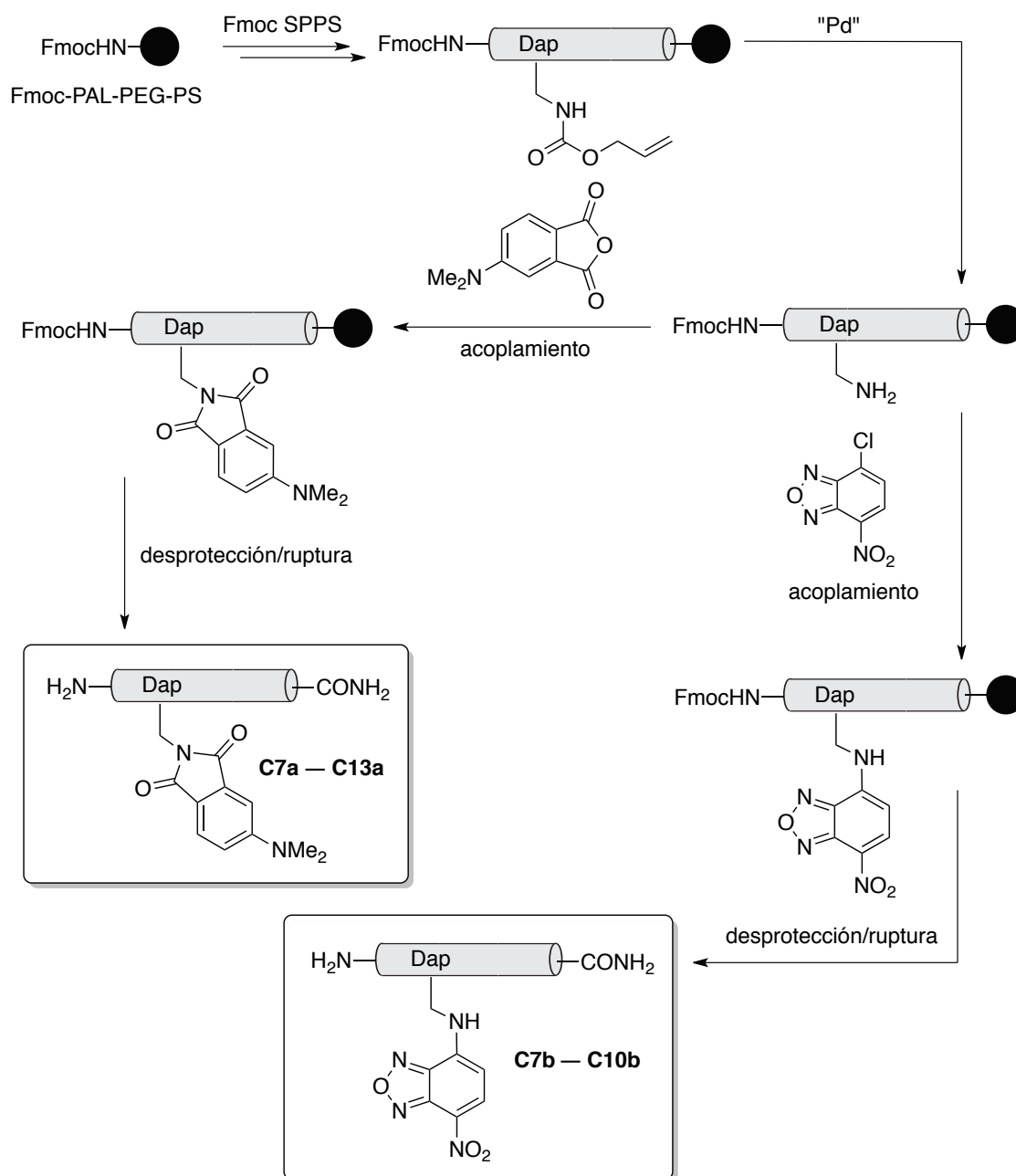


Figura 59. Modelo de la proteína con el péptido que contiene el fluoróforo solvatocrómico 4-DMAP en la posición 4 que ocupa la Phe en el péptido p107.

Síntesis de los sensores peptídicos

Planteamiento sintético

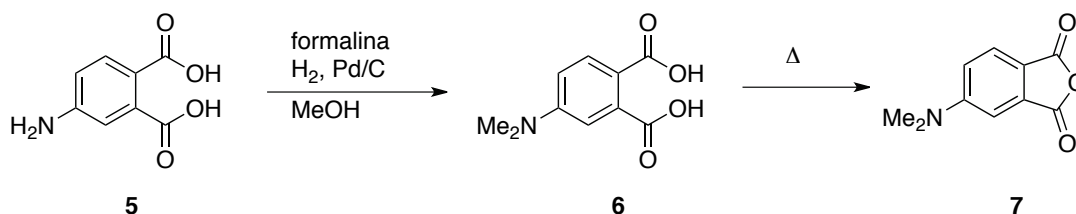
Para la síntesis de los sensores solvatocrómicos de ciclina A se siguió la estrategia que se muestra a continuación, basada en la introducción de los fluoróforos a los péptidos mientras estos están todavía unidos al soporte sólido.



Esquema 16. Planteamiento sintético seguido para los derivados peptídicos que incorporan los fluoróforos solvatocrómicos 4-DMAP (péptidos **a**) o NBD (péptidos **b**) en la cadena lateral del residuo de Dap.

Síntesis del anhídrido de 4-DMAP

La síntesis del anhídrido 4-dimetilaminoftálico se llevó a cabo siguiendo procedimientos ya descritos con pequeñas modificaciones.⁷⁹

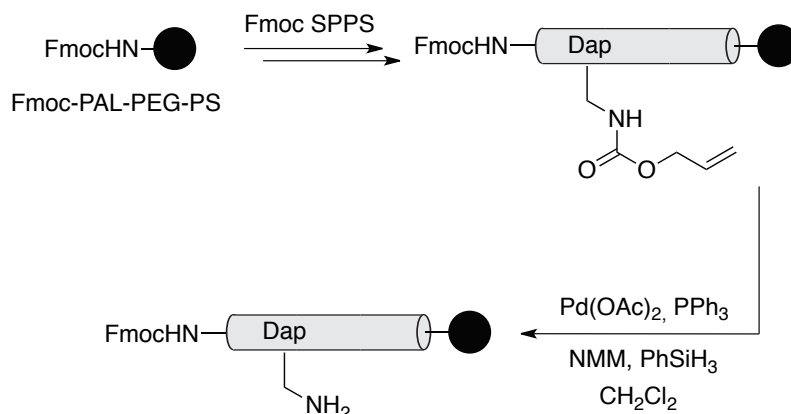


Esquema 17. Síntesis del anhídrido 4-dimetilaminoftálico a partir del ácido 4-aminofáltico.

Para sintetizar el anhídrido 4-dimetilaminoftálico (**7**) se partió del ácido 4-aminofáltico (**5**). Puesto que la amina es muy poco nucleófila, se planteó realizar una aminación reductora para la alquilación de dicha amina. Para ello, el ácido 4-aminofáltico se trató con formalina (disolución de formaldehído al 36% en agua) y Pd/C en metanol bajo atmósfera de hidrógeno. A continuación, se eliminaron el Pd/C mediante filtración sobre celita y el disolvente bajo presión reducida y se obtuvo **6** como un sólido blanco. La posterior deshidratación de **6** para dar el producto **7** permite su separación en forma de un sólido amarillo intenso con un rendimiento del 81%.

Síntesis de los derivados peptídicos

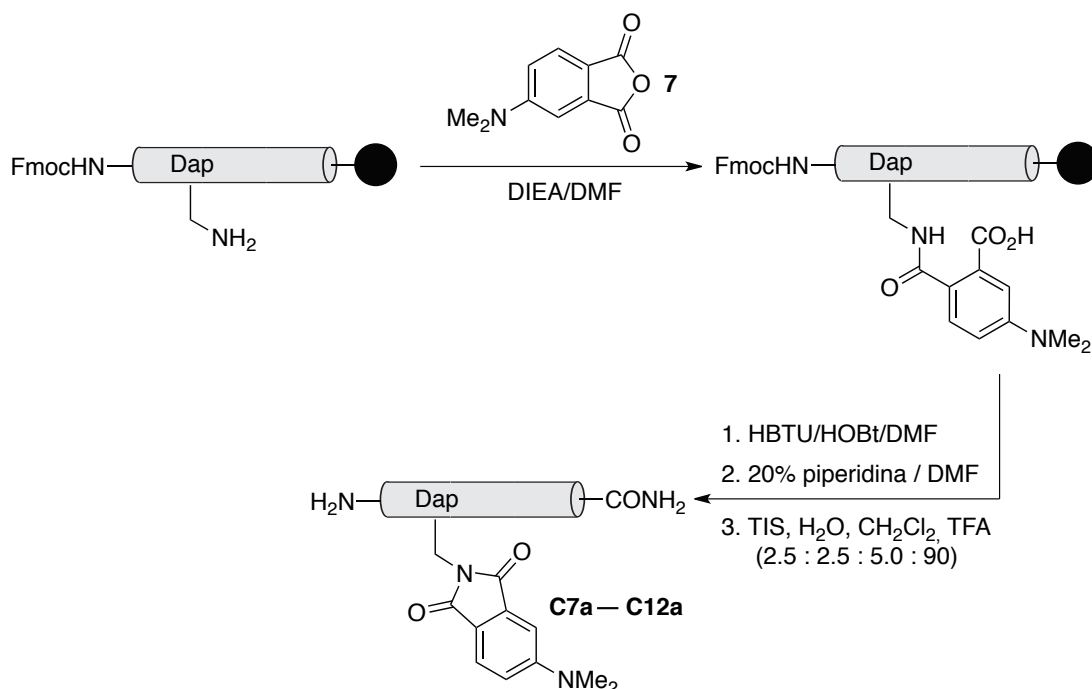
Para la síntesis de los derivados peptídicos **C7-C12** se optó por la modificación en fase sólida de los péptidos ortogonalmente desprotegidos en la funcionalidad seleccionada para la conjugación del fluoróforo. Para desproteger selectivamente su cadena lateral, el ácido 2,3-diaminopropanoico (Dap) se introdujo en los péptidos con la cadena lateral protegida por un grupo alloc, como ya se ha comentado con anterioridad, permite su eliminación ortogonal mediante catálisis con Pd. Posteriormente se realiza la conjugación selectiva de la cadena así desprotegida con el fluoróforo deseado. Brevemente, la eliminación del grupo alloc se llevó por tratamiento con Pd(OAc)₂, PPh₃, PhSiH₃ y NMM en CH₂Cl₂.



Esquema 18. Procedimiento seguido para la síntesis de los péptidos unidos a la resina y desprotegidos selectivamente en el residuo de Dap.

Acoplamiento del anhídrido 4-dimetilaminoftálico

Para la introducción del fluoróforo las resinas peptídicas se trataron con el anhídrido 4-dimetilaminoftálico (**7**) y una disolución de DIEA 0.195M en DMF. Después de agitar durante una hora se añadió una disolución de HBTU/HOBt 0.2M en DMF y la mezcla de reacción resultante se deja agitando durante unas 12 h.



Esquema 19. Procedimiento para la síntesis de los péptidos **C7a – C12a**.

Las reacciones se monitorizaron mediante HPLC-MS en condiciones habituales. En la figura 60 se representa el resultado para el caso del péptido **C10a**, observándose un pico mayoritario correspondiente a la ftalimida totalmente acoplada al péptido con su extremo N-terminal todavía protegido con el grupo Fmoc.

En el cromatograma que se hizo midiendo a una longitud de onda de 222 nm (parte superior) se observan tres picos, el segundo pico a 15.2 min se ha asignado al péptido con el fluoróforo semiacoplado, y el tercer pico del cromatograma a 15.6 min, corresponde al péptido con el fluoróforo ya acoplado **C10a**. Además este último pico también se detecta a 395nm (cromatograma inferior), ya que a esa longitud de onda el fluoróforo totalmente acoplado absorbe de forma eficiente.

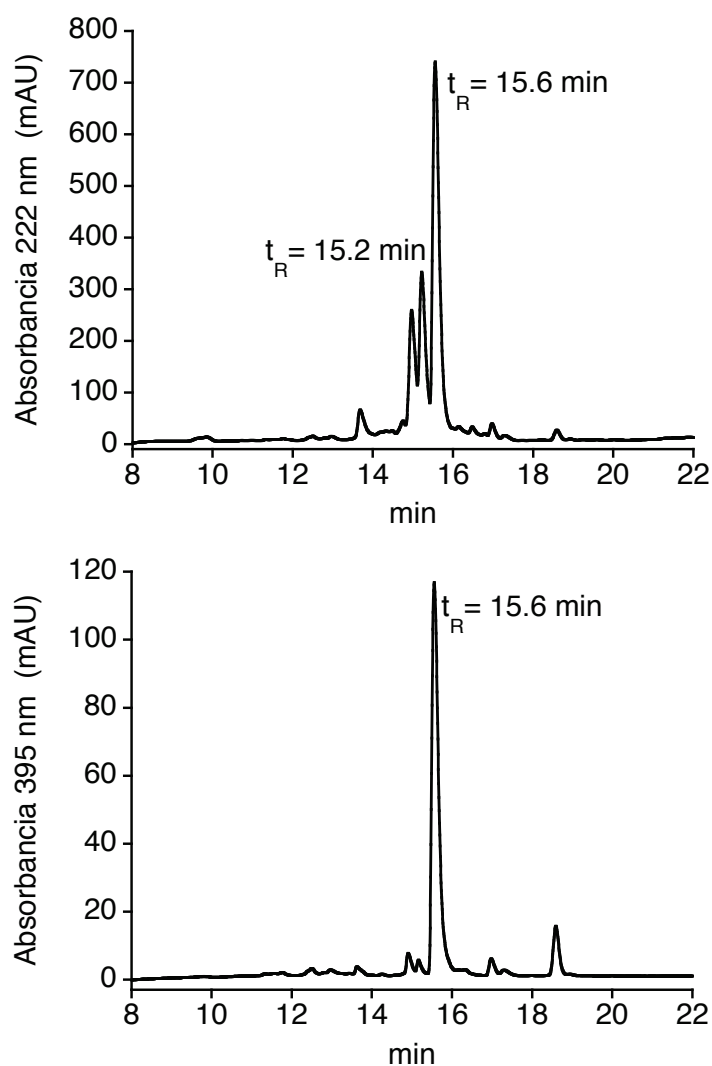


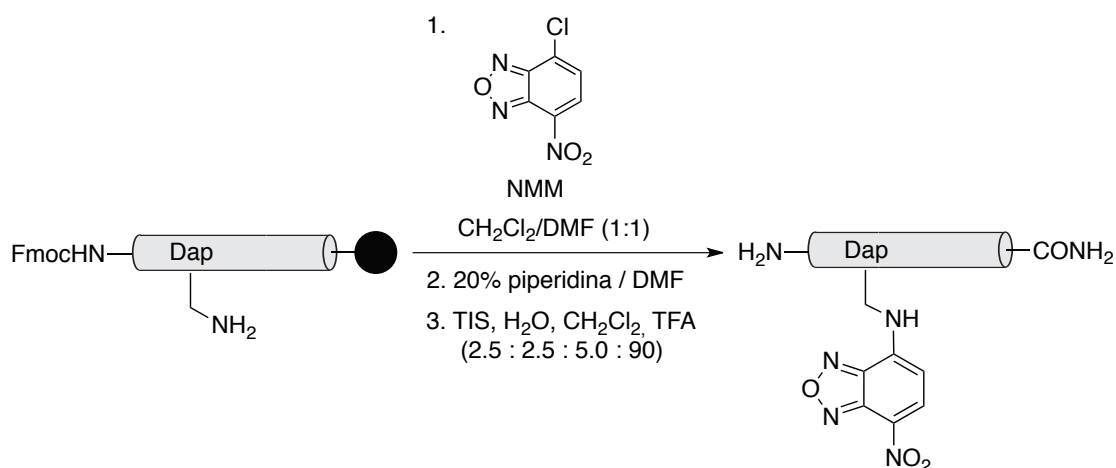
Figura 60. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 15.6 min corresponde al producto **C10a**.

Una vez comprobada la eficiencia del acoplamiento, se desprotegió el extremo amino-terminal en fase sólida utilizando las condiciones estándar de 20% piperidina en DMF, se realizó la desprotección y ruptura del péptido de la resina utilizando el procedimiento habitual consistente en un tratamiento con la mezcla de desprotección con atrapadores de cationes (50 μL CH_2Cl_2 , 25 μL H_2O , 25 μL TIS, 900 μL TFA) y se procedió a la precipitación del péptido en éter. Finalmente se realizó la purificación del producto por HPLC en fase reversa. El péptido **C10a** se aisló como un sólido amarillo intenso con un rendimiento aproximado del 26%. Para los péptidos **C7a**, **C8a**, **C9a**, **C11a** y **C12a** se siguieron procedimientos análogos a los utilizados para **C10a**, aislándose todos los péptidos como sólidos de color amarillo intenso y con rendimientos similares a **C10a**.

Para el péptido **C13a**, en el que el fluoróforo va acoplado en el extremo N-terminal del péptido, el procedimiento sintético seguido fue muy similar con la salvedad de que se sintetiza todo el péptido, a continuación se desprotege el extremo amino-terminal en las condiciones estándar de 20% piperidina en DMF y posteriormente se realiza el acoplamiento del anhídrido en las mismas condiciones ya descritas para los demás péptidos. Una vez acoplado, se lleva a cabo la desprotección y ruptura del péptido de la resina usando las condiciones habituales y el producto se purifica por HPLC en fase reversa. El péptido **C13a** se aisló como un sólido amarillo intenso con un rendimiento del 23%.

Acoplamiento del cloruro de NBD

El acoplamiento del cloruro de NBD al péptido **C7** se llevó a cabo tratando la resina, en la que se ha desprotegido selectivamente la amina sobre la que se va a realizar el acoplamiento, con el cloruro de NBD en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ en proporción 1:1 y en presencia de N-metilmorfolina (NMM). Esta mezcla de reacción se dejó agitando durante unas 24 horas.



Esquema 20. Síntesis del péptido **C7b**.

El análisis de la reacción por HPLC-MS permitió observar la aparición de un pico mayoritario correspondiente péptido **C7b** con el fluoróforo acoplado y que presenta su extremo amino-terminal todavía protegido con el grupo Fmoc.

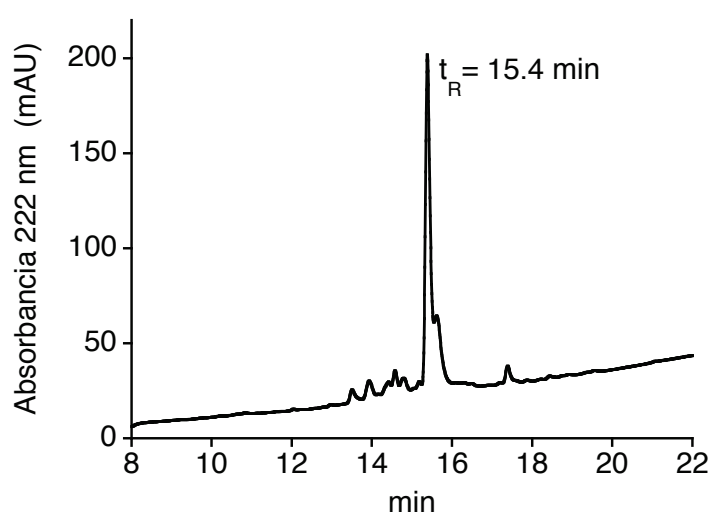


Figura 61. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 15.4 min se corresponde al péptido **C7b**.

A continuación se eliminó el grupo Fmoc del extremo N-terminal en fase sólida y se procedió a la desprotección y ruptura del péptido de la resina siguiendo los procedimientos ya detallados previamente. El producto **C7b** se purificó por HPLC en fase reversa, se liofilizó y aisló como un sólido blanco con un rendimiento aproximado del 28%. Para los demás péptidos **C8b**, **C9b** y **C10b** se siguieron procedimientos análogos a los usados para **C7b**. Los péptidos se aislaron como sólidos de color blanco con rendimientos similares al obtenido para **C7b**.

Ensayos con ciclina A

Estudios fluorescentes de las interacciones péptido-ciclina A

Los ensayos de fluorescencia se llevaron a cabo con la proteína ciclina A proporcionada por el grupo del Prof. Enrique Pérez Payá, del Departamento de Química Biológica del Centro de Investigación Príncipe Felipe. En este caso, la ciclina fue expresada en plásmidos recombinantes en *E. Coli* como proteína de fusión con un Tag de histidinas y purificada a través de una columna de Ni²⁺.

Se realizaron los ensayos de fluorescencia de los péptidos con ciclina A para estudiar los cambios inducidos en los espectros de emisión como consecuencia del reconocimiento de la proteína. Experimentos preliminares mostraron que al irradiar a la longitud de onda de excitación correspondiente a cada fluoróforo (λ_{exc} 4-DMAP = 395 nm; λ_{exc} NBD = 478 nm) todos los péptidos emiten débilmente cuando se encuentran en disolución en ausencia de ciclina A.

Desafortunadamente, la incubación de las disoluciones 1.5 μM de cada péptido con ciclina A mostró que tanto los péptidos que contienen el fluoróforo NBD (**C7b**, **C8b**, **C9b** y **C10b**), como la mayoría de los péptidos que contienen el fluoróforo 4-DMAP (**C7a**, **C8a**, **C9a**, **C12a** y **C13a**) no muestran ningún cambio en la señal fluorescente cuando se encuentran en presencia de la proteína, obteniéndose prácticamente el mismo espectro de emisión que el que mostraban en ausencia de la misma.

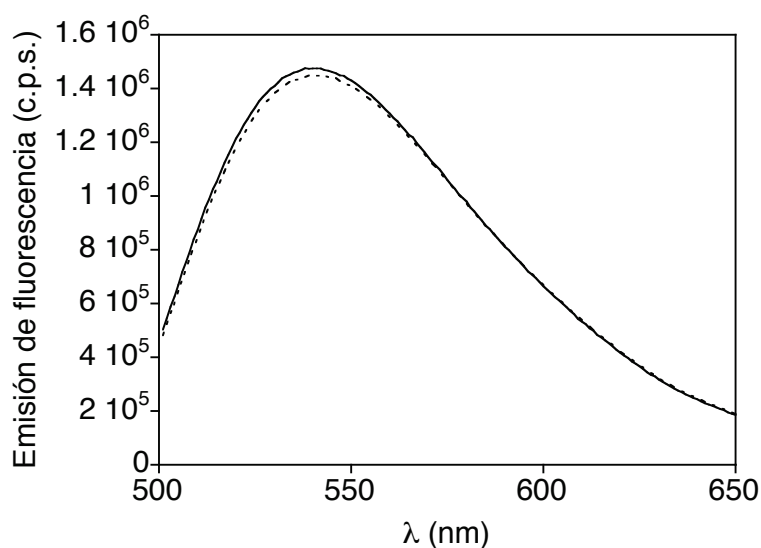


Figura 62. Línea discontinua: espectro de fluorescencia péptido **C7b** 1.5 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 478$ nm. Línea continua: muestra anterior en presencia de ciclina A 2.5 μM .

En contraste con estos resultados, los péptidos **C10a** ($\text{H}_2\text{N-AKRRLG-Dap(4-DMAP)-E-CONH}_2$) y **C11a** ($\text{H}_2\text{N-AKRRLI-Dap(4-DMAP)-E-CONH}_2$), que presentan el fluoróforo 4-DMAP en la posición 5 de la secuencia consenso (RxLhh'), mostraron un aumento significativo en la señal de emisión así como un desplazamiento hipsocrómico como resultado de la incubación con ciclina A.

En el espectro que se muestra a continuación, correspondiente al péptido **C11a**, se observa una banda con el máximo de emisión en torno a 570 nm para el espectro del péptido solo en disolución. Cuando se añade la ciclina, se produce un desplazamiento del máximo de emisión a aproximadamente 512 nm y además se observa un aumento significativo de la emisión de fluorescencia de unas 10 veces. Este resultado indica que se produce interacción entre el péptido y la proteína y que la proximidad del surco hidrofóbico de la ciclina A provoca el cambio en el espectro de emisión del fluoróforo 4-DMAP.

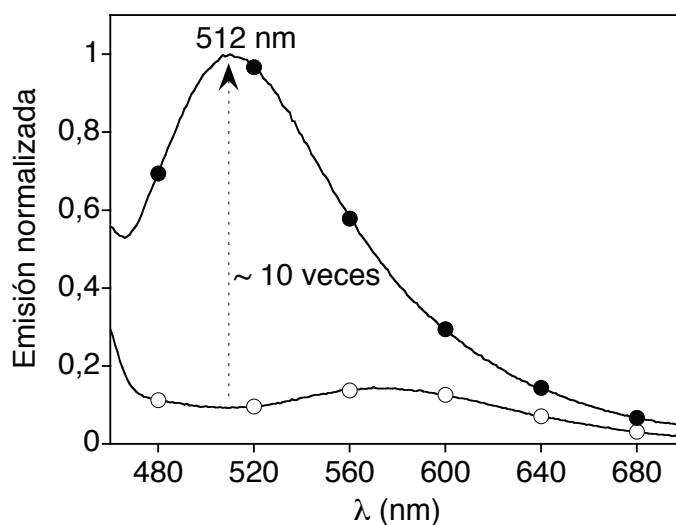


Figura 63. Espectro de fluorescencia del péptido **C11a** 1.5 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 395$ nm, antes (\circ) y después de la adición de 6 equivalentes de ciclina A (\bullet).

Viendo que los péptidos **C10a** y **C11a** presentaban las mejores propiedades de emisión, se decidió caracterizar más en profundidad su interacción con ciclina A. Para ello se realizaron valoraciones en las que se añadieron sucesivamente alícuotas de una madre de ciclina A (97 μM) sobre una disolución 1.5 μM de los péptidos.

Las valoraciones fluorescentes muestran que el péptido **C11a**, además de mostrar una mayor emisión después de la unión a ciclina, también se une a esta con una mejor constante ($K_D \approx 8.4$ μM) que el péptido **C10a** ($K_D \approx 18.1$ μM). El ajuste para el cálculo de la constante se llevó a cabo considerando el modelo de interacción 1:1 que se ha discutido con anterioridad.

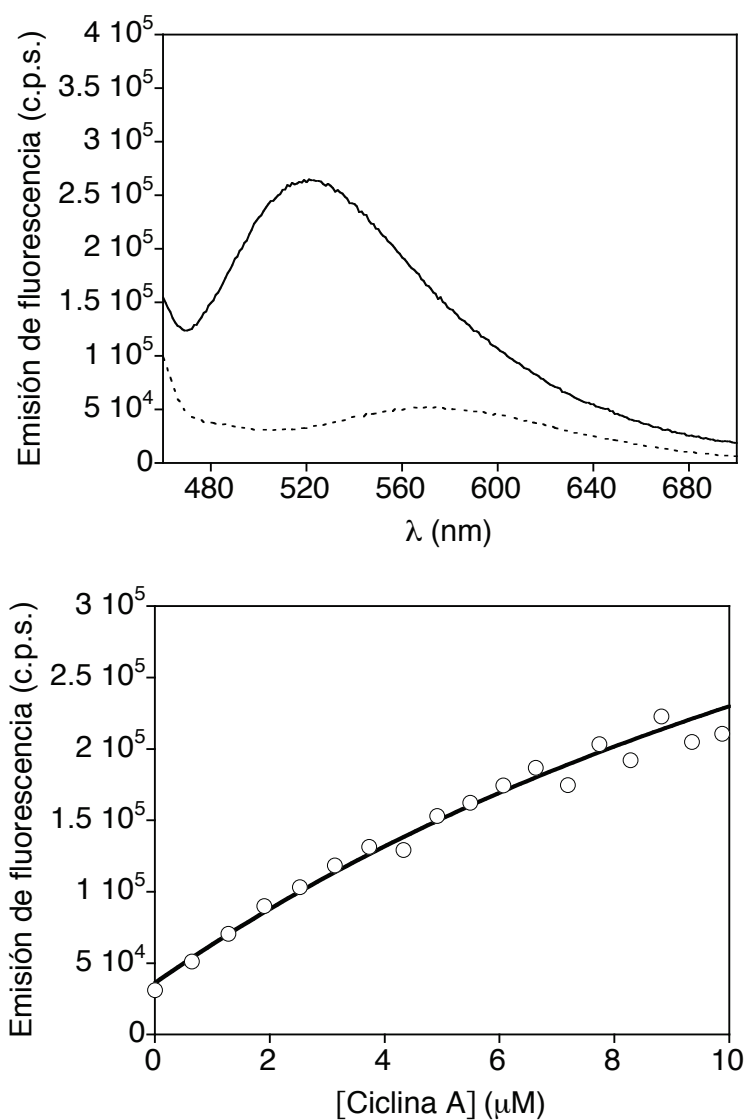


Figura 64. Arriba. Línea discontinua: espectro de fluorescencia del péptido **C10a** 1.5 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{exc} = 395$ nm. Línea continua: misma muestra en presencia de ciclina A ≈ 9.9 μ M. Abajo. Gráfica de emisión de fluorescencia a 512 nm frente a la concentración de ciclina A y la mejor curva de ajuste de la unión.

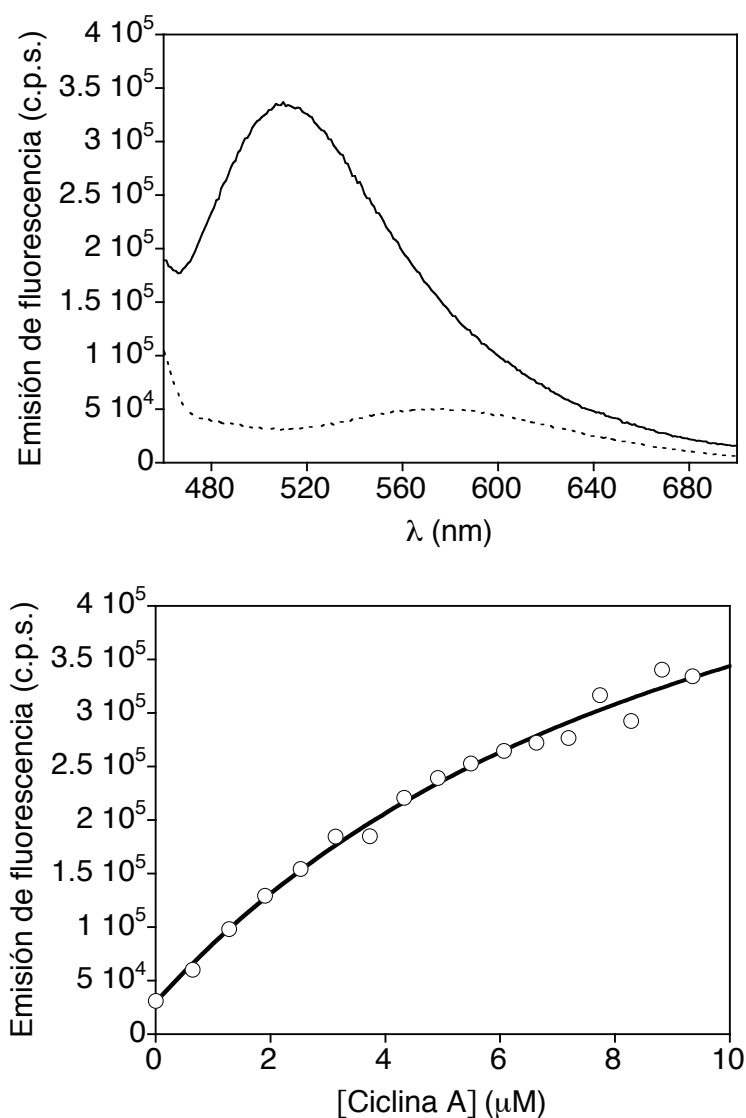


Figura 65. Arriba. Línea discontinua: espectro de fluorescencia del péptido **C11a** 1.5 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{exc} = 395$ nm. Línea continua: misma muestra en presencia de ciclina A ≈ 9.3 μ M. Abajo. Gráfica de emisión de fluorescencia a 512 nm frente a la concentración de ciclina A y la mejor curva de ajuste de la unión.

Aprovechando estos cambios en la emisión es posible obtener información físicoquímica relevante del surco de unión a ciclina A. Comparando el desplazamiento de Stokes del complejo **C11a**-ciclina A con los desplazamientos observados para el péptido en disolventes de distinta polaridad es posible obtener la polaridad en el entorno del sensor.

Para el cálculo de la polaridad se representa el desplazamiento de Stokes, expresado como la diferencia entre los picos de absorción y emisión en números de onda (cm^{-1}), frente a la constante dieléctrica de cada disolvente (figura 67). El ajuste lineal de estos datos proporciona la relación entre ambos parámetros ($1/\lambda_{\text{abs}} - 1/\lambda_{\text{em}} = 5716 + 18.8 \times \epsilon$). La introducción del desplazamiento de Stokes observado para el péptido unido a la ciclina A en esta ecuación permite obtener una constante dieléctrica aparente del surco hidrofóbico CBG de ≈ 3.8 . Este valor está en concordancia con otras constantes dieléctricas aparentes encontradas para otras zonas de unión hidrofóbicas y los valores usados comúnmente en estudios computacionales de proteínas.¹⁰⁸

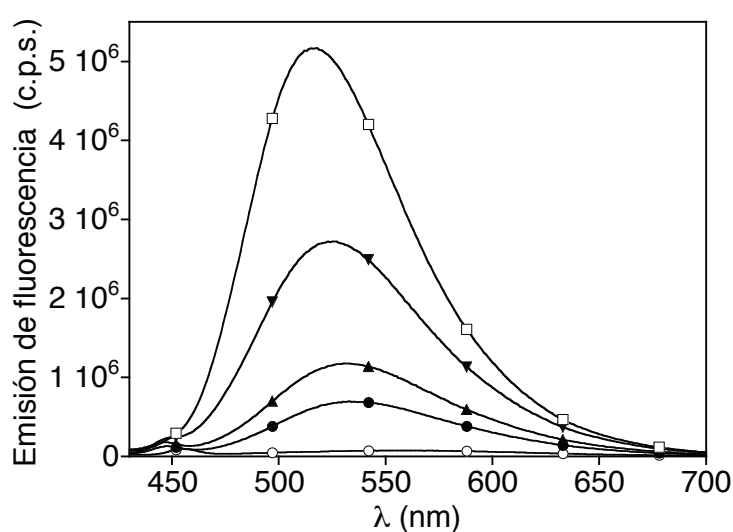


Figura 66. Espectro de emisión del péptido **C11a** $1.5 \mu\text{M}$ en diferentes disolventes: agua (○); metanol (●); etanol (▲); isopropanol (▼); acetonitrilo (□), $\lambda_{\text{exc}} = 395 \text{ nm}$.

108 a) Haque, Md. E.; Ray, S.; Chakrabarti, A. J. *Fluorescence* **2000**, 10, 1. b) Cohen, B. E.; McAnaney, T. B.; Park, E. S.; Jan, Y. N.; Boxer, S. G.; Jan, L. Y. *Science* **2002**, 296, 1700. c) Sinkeldam, R. W.; Tor, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2523.

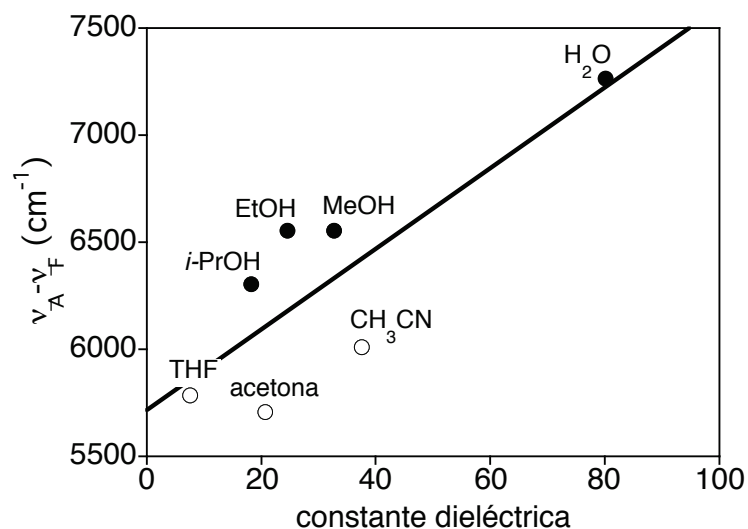


Figura 67. Representación del desplazamiento de Stokes de **C11a** en distintos disolventes (expresada como $1/\lambda_{\text{abs}} - 1/\lambda_{\text{em}}$) frente las constantes dieléctricas de los distintos disolventes.

Puesto que el péptido **C11a** es el que une mejor a ciclina A y el que experimenta un mayor aumento en la señal fluorescente después de la unión a ciclina A, se realizaron ensayos de fluorescencia de dicho péptido en presencia de otras proteínas como seroalbúmina bovina (BSA), inmunoglobulina G (IgG) o la histona H1, para comprobar su especificidad por ciclina A. Como se observa en la figura siguiente ninguna de las proteínas es capaz de producir un cambio en la señal de emisión del sensor, lo que demuestra su alta especificidad por ciclina A.

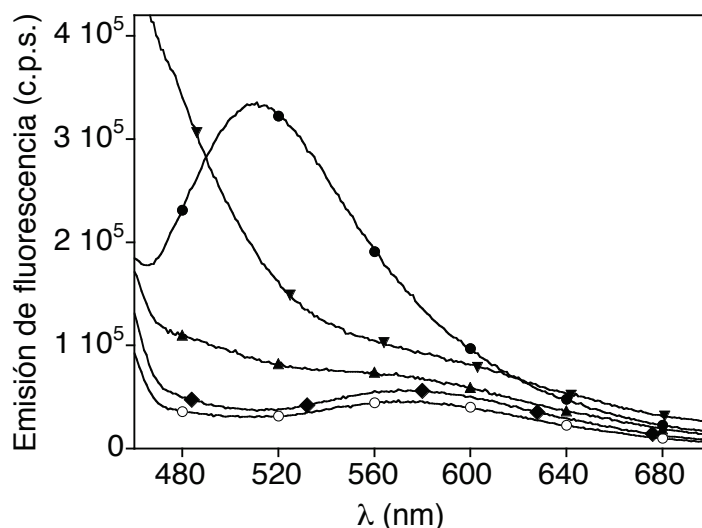


Figura 68. Espectro de emisión del péptido **C11a** 1.5 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 395$ nm (\circ), y la misma muestra en presencia de ciclina A 10 μM (\bullet); BSA 10 μM (\blacktriangle); IgG 10 μM (\blacktriangledown) e histona H1 10 μM (\blacklozenge).

Estudios preliminares con células HeLa, realizados por el grupo de investigación del Prof. Enrique Pérez Payá, sugieren que el péptido **C11a** no se internaliza eficientemente, pero en cambio no parece tener un efecto tóxico en las células incluso después de una incubación prolongada a altas concentraciones de péptido.

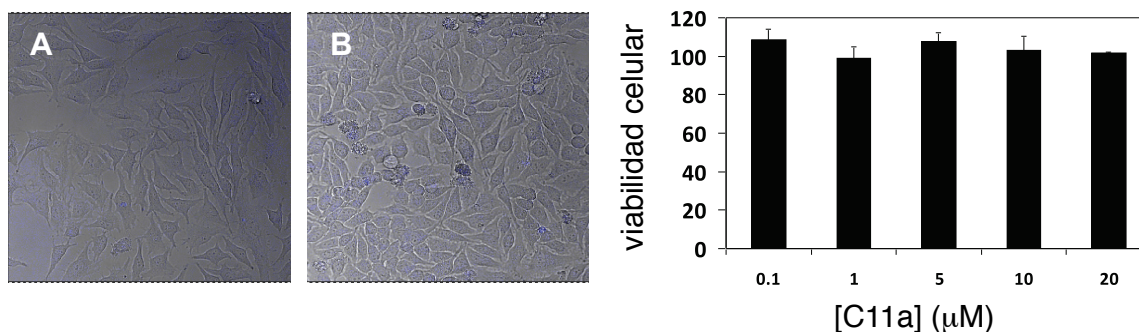


Figura 69. Izquierda. Internalización celular de **C11a**. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa incubadas durante 2 horas tanto en ausencia (A) como en presencia del péptido **C11a** 20 μM (B). **Derecha.** Ensayos de viabilidad celular de células HeLa incubadas con concentraciones crecientes del péptido **C11a** durante 24 horas.

Estudios de dinámica molecular

Con la intención de entender mejor la interacción de los péptidos **C10a** y **C11a** con ciclina A, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular de ambos complejos péptido-ciclina. Estos estudios fueron realizados por el grupo de investigación del Dr. Hugo Gutiérrez de Terán de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica – SERGAS.

El primer dato interesante obtenido de las simulaciones es la estabilidad de las interacciones entre **C11a** y ciclina A, presentando una media de 6 enlaces de hidrógeno simultáneos entre el péptido y la ciclina, principalmente con los residuos Asp²¹⁶, Trp²¹⁷, Gln²⁵⁴, Asp²⁸³, Ile²⁸¹ (en la cadena principal) y Tyr²⁸⁰ del surco de unión a ciclina (CBG). Curiosamente, el residuo fluorogénico (4-DMAP) permanece sustancialmente introducido en el bolsillo hidrofóbico del CBG formado por los residuos Ile²¹³, Leu²¹⁴ y Met²¹⁰, ayudado por los contactos internos entre el fluoróforo y la Leu³ del péptido que se une a ciclina cerca del Trp²¹⁷ como se observa en la figura siguiente.

Para el péptido **C10a**, cuya única diferencia es la sustitución en la posición 4 de la secuencia consenso por una Gly (Ile para **C11a**), se realizó un análisis

similar. Según las simulaciones, el péptido **C10a** adopta una unión a ciclina ligeramente diferente en la que la Gly permite un puente salino interno entre la Arg² y el Glu⁶ del péptido. Esta conformación provoca un desplazamiento en el modo de unión de la Leu³ y de 4-DMAP con el surco de unión CBG. Además, esta interacción interna entre la Arg² y el Glu⁶ es la responsable de la disminución de la media de enlaces de hidrógeno entre el péptido con el surco, pasando de 6 a 4. Sin embargo, la superficie del fluoróforo accesible al disolvente no muestra diferencias significativas entre los dos complejos péptido-ciclina A.

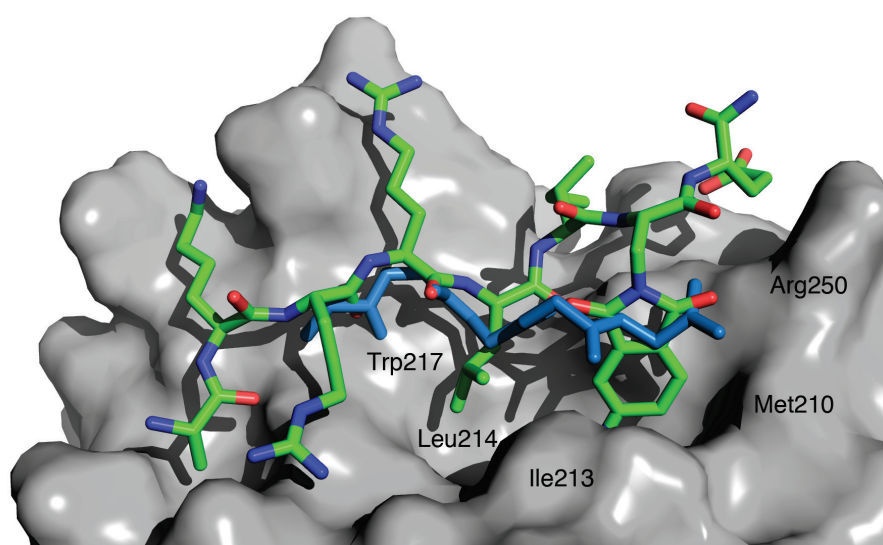


Figura 70. Instantánea de la trayectoria de dinámica molecular del complejo **C11a**-ciclina A, en la que se observa la interacción de **C11a** (en líneas verdes) con el surco hidrofóbico de ciclina A (CGB) y en la que se puede apreciar como el fluoróforo se introduce en el surco. En azul se representa la cadena principal del péptido de la estructura cristalina usada como punto de partida de estos estudios (PDB 1OKV).

Uso de las sondas como herramientas para la identificación de inhibidores de ciclina A

Finalmente, se propuso demostrar el uso de estas sondas como herramientas para la identificación de posibles inhibidores de ciclina A. Para ello se sintetizaron 3 péptidos cortos, que son inhibidores conocidos de la actividad enzimática del complejo CDK2-ciclina A, cuyas secuencias se muestran a continuación.²⁴



Los péptidos se sintetizaron en fase sólida sin ninguna modificación adicional siguiendo los protocolos ya descritos y a continuación se purificaron por HPLC en fase reversa.

Se realizaron valoraciones de competición de cada uno de estos péptidos frente al derivado **C11a**. En la gráfica siguiente se muestra el ensayo de desplazamiento fluorescente de **C11a** con el inhibidor **I1**. El ajuste de los datos obtenidos a un modelo estándar de competición,¹⁰⁹ detallado en la parte experimental, permitió reproducir las propiedades de inhibición de quinasas de los péptidos, observándose las mejores constantes de unión para aquellos péptidos que presentan valores de IC₅₀ más bajos. De este modo, mientras el péptido **I1**, con un IC₅₀ = 0.67 μM, mostró una buena constante de unión in vitro (K_D ≈ 0.31 μM), los péptidos **I2** (IC₅₀ = 0.73 μM) e **I3** (IC₅₀ = 1.4 μM) mostraron constantes de unión más débiles por ciclina A (K_D ≈ 0.73 y 4.6 μM respectivamente).

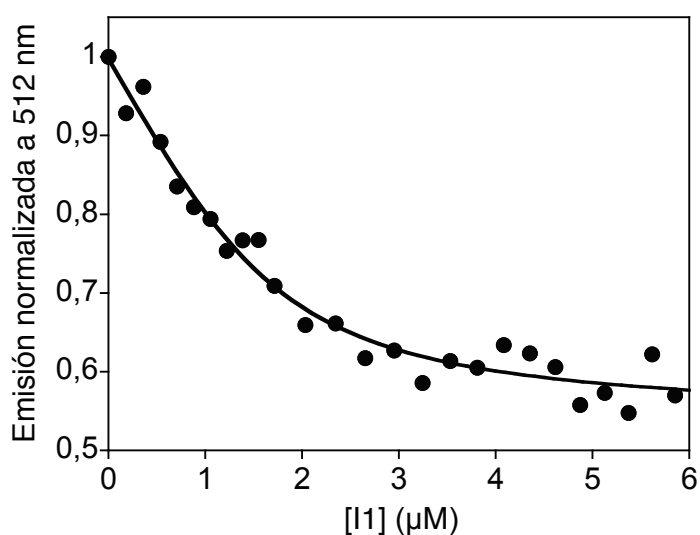


Figura 71. Gráfica de emisión a 512 nm de **C11a** 1.5 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6 con ciclina A 1.5 μM y con cantidades crecientes del inhibidor **I1**. La línea representa el mejor ajuste de los datos para un modelo de competición 1:1.

109 Wang, Z.-X. FEBS Lett. **1995**, 360, 111.

Conclusiones

Se han diseñado y sintetizado varios péptidos basados en secuencias peptídicas que se unen al surco de reconocimiento de los sustratos de ciclina A (CBG) y que incorporan aminoácidos no naturales en diversas posiciones de la secuencia consenso.

Dos de estos péptidos, **C10a** y **C11a** que incluyen el fluoróforo 4-DMAP en la posición 5 de la secuencia consenso, interaccionan con el surco de reconocimiento de sustratos de ciclina A. La formación de los complejos de estos péptidos con ciclina A produce un aumento en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento hipsocrómico de las bandas de emisión, consistente con la protección fluoróforo 4-DMAP del agua en el interior del surco de reconocimiento.

También se ha demostrado que la unión de **C11a** a ciclina A es específica y que este sensor puede ser utilizado para identificar inhibidores de ciclina de un modo sencillo mediante valoraciones de competición.¹¹⁰

110 Los resultados de este trabajo han sido publicados en: Pazos, E.; Pérez, M.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Orzáez, M.; Guevara, T.; Mascareñas, J. L.; Vázquez, M. E. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7629.

Sensores de cremalleras de leucinas y del FT c-Jun

Diseño de sensores de cremalleras de leucinas

El desarrollo de sensores específicos para detectar factores de transcripción (FT) podría ofrecer herramientas de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades, aunque se trata de un tema que se ha investigado muy poco.

Muchos factores de transcripción, como los bZip, utilizan motivos de cremallera de leucina como elementos de dimerización. Como se ha comentado con anterioridad, estas proteínas presentan poca estructura en forma monomérica pero cuando dimerizan se pliegan en una estructura secundaria de hélice α .¹¹¹ Teniendo esto en cuenta, se planteó la posibilidad de aprovechar dicho cambio conformacional para modular la sensibilización de un lantánido^{82,112} y utilizar estos cambios en la emisión del metal como una estrategia general para detectar proteínas que se plieguen utilizando el motivo cremallera de leucina.

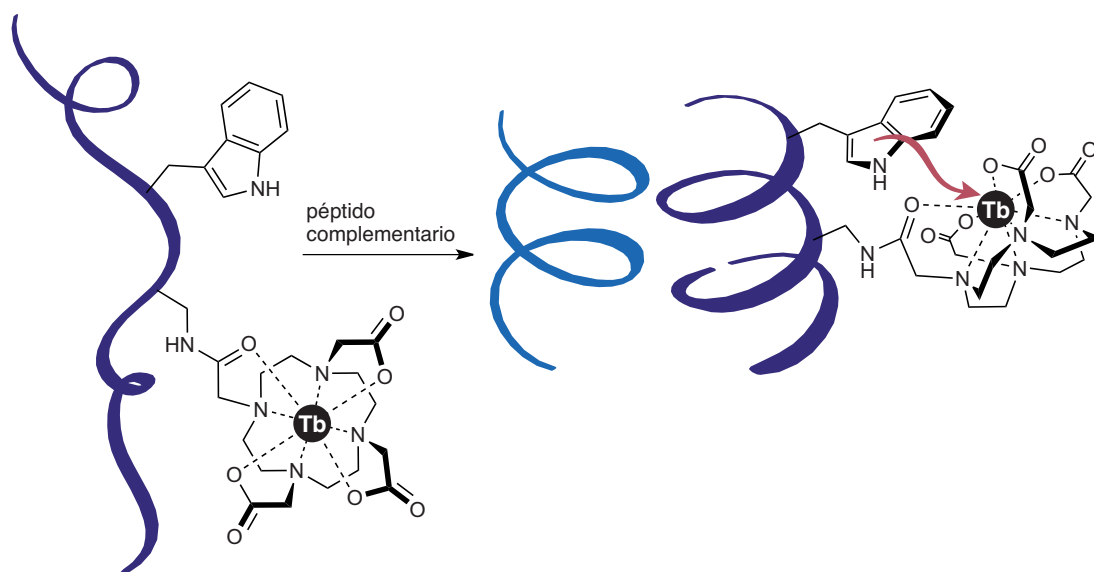


Figura 72. Representación del cambio conformacional que se produce por la dimerización de hélices α y que supone una disminución en la distancia entre dador y aceptor.

- 111 a) Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6, 197. b) Verkhivker, G. M. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2005**, 58, 706. c) Kohler, J. K.; Schepartz, A. *Biochemistry* **2001**, 40, 130. d) O'Neil, K. T.; Shuman, J. D.; Ampe, C.; DeGrado, W. F. *Biochemistry* **1991**, 30, 9030.
- 112 a) McMahon, B.; Mauer, P.; McCoy, C. P.; Lee, T. C.; Gunnlaugsson, T. J. *Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17542. b) Gunnlaugsson, T.; Harte, A. J.; Leonard, J. P.; Nieuwenhuyzen, M. *Chem. Commun.* **2002**, 2134.

En primer lugar se estudió la viabilidad de esta estrategia en un sistema modelo basado en las secuencias peptídicas *de novo*, diseñadas para formar heterodímeros *coiled-coil*.¹¹³ Estas secuencias complementarias designadas como **K₄**, en la que se repite la heptada VSALKEK, y **E₄**, que repite la heptada VSALEKE, presentan interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de Glu, cargadas negativamente, y las de Lys, cargadas positivamente, de las posiciones *e* y *g* de las heptadas, lo que dirige la formación directa de complejos heterodiméricos frente homodiméricos.

Sobre esta base, se decidió modificar la secuencia modelo **K₄** introduciendo en ella los elementos requeridos para la transferencia de energía y sensibilización del complejo de Tb(III). Dada la importancia de los residuos de Val y Leu de las posiciones *a* y *d* para la integridad estructural de los complejos *coiled-coil*, se decidió incorporar el residuo dador de Trp y el complejo de lantánido en diferentes posiciones de la superficie externa de las cremalleras de leucinas.^{60b, 114} De este modo, el complejo macrocíclico DOTA-[Tb³⁺] se introdujo en la posición *f* mientras que la antena de Trp se colocó en las posiciones *i* + 4 o *i* - 4 en la misma cara de la hélice α (posiciones *b* y *c*), de modo que en la forma plegada estos residuos se encuentren próximos al complejo metálico y como consecuencia se maximicen la eficiencia en la transferencia de energía y la luminiscencia del metal.

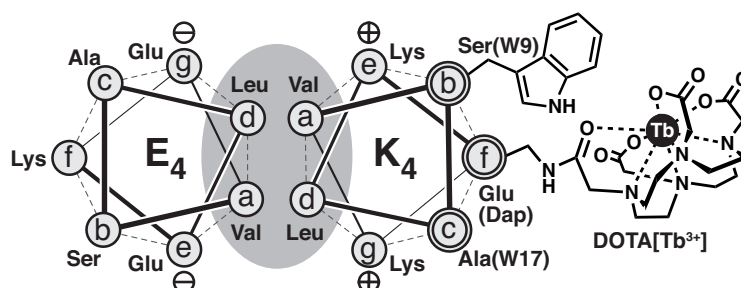


Figura 73. Proyección helicoidal de una heptada de **E₄** y **K₄** en la que se indican la antena de Trp y el complejo DOTA[Tb³⁺] en la cara externa de la hélice de uno de los derivados peptídicos (péptido ^{W9}K₄[Tb]). Las posiciones *a* y *d* forman el núcleo hidrofóbico y las posiciones *e* y *g* establecen interacciones electrostáticas complementarias.

113 De Crescenzo, G.; Litowski, J. R.; Hodges, R. S.; O'Connor-McCourt, M. D. *Biochemistry* **2003**, 42, 1754.

114 Zhang, F.; Timm, K. A.; Arndt, K. M.; Woolley, G. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3943.

Por tanto, para el estudio de este sistema se diseñaron las siguientes secuencias peptídicas que se muestran a continuación, en las que ϕ representa un residuo de Dap modificado en su cadena lateral con el complejo macrocíclico DOTA[Tb³⁺].

	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg
E₄:	FVSALEKE	VSALEKE	VSALEKE	VSALEKE
^{w9} K₄[Tb]:	VSALKEK	VWALK ϕ K	VSALKEK	VSALKEK
^{w17} K₄[Tb]:	VSALKEK	VSALK ϕ K	VSWLKEK	VSALKEK
^{w9/17} K₄[Tb]:	VSALKEK	VWALK ϕ K	VSWLKEK	VSALKEK

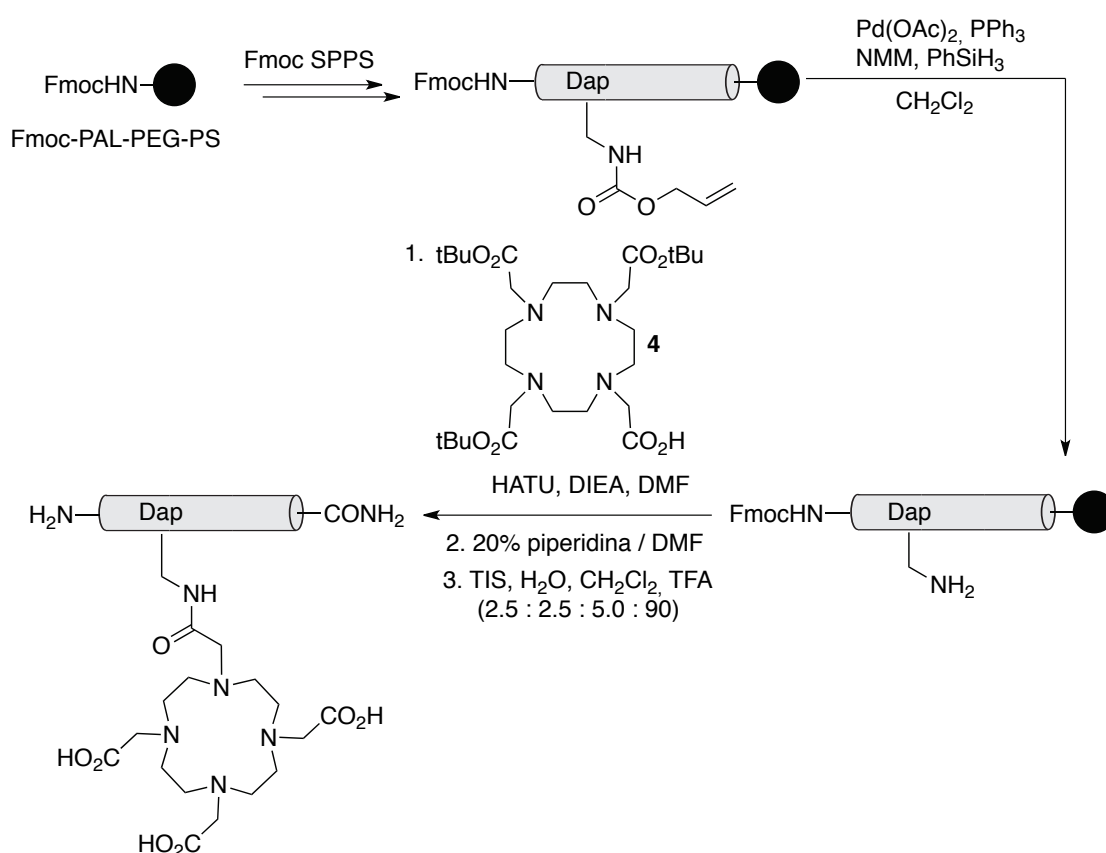
Síntesis de los péptidos E₄ y K₄

Síntesis de los péptidos derivados de K₄

Para la síntesis de los péptidos K₄ se propuso un planteamiento sintético basado en la modificación en fase sólida de los péptidos ortogonalmente desprotegidos en la funcionalidad seleccionada para la conjugación del DOTA. La metodología se ejemplifica para la preparación del péptido ^{w17}K₄[Tb].

El ácido 2,3-diaminopropanoico se introdujo en el péptido con su cadena lateral protegida por un grupo alloc, lo que posibilita su eliminación ortogonal mediante catálisis con Pd y permite la posterior conjugación de dicha cadena desprotegida con el DOTA tris(t-Bu) éster.

La eliminación del grupo alloc se llevó a cabo en condiciones habituales (Pd(OAc)₂, PPh₃, PhSiH₃ y NMM en CH₂Cl₂). A continuación, al péptido resultante con la cadena lateral desprotegida se acopló el ligando quelatante **4** utilizando HATU como agente de acoplamiento en presencia de DIEA en DMF.



Esquema 21. Síntesis del péptido ^{w17}K₄.

Una vez realizado el acoplamiento, se desprotegió una pequeña cantidad de la resina para su análisis por HPLC-MS obteniéndose el cromatograma que se muestra a continuación, en el que se observó un pico mayoritario correspondiente al producto deseado con el extremo N-terminal protegido con el grupo Fmoc.

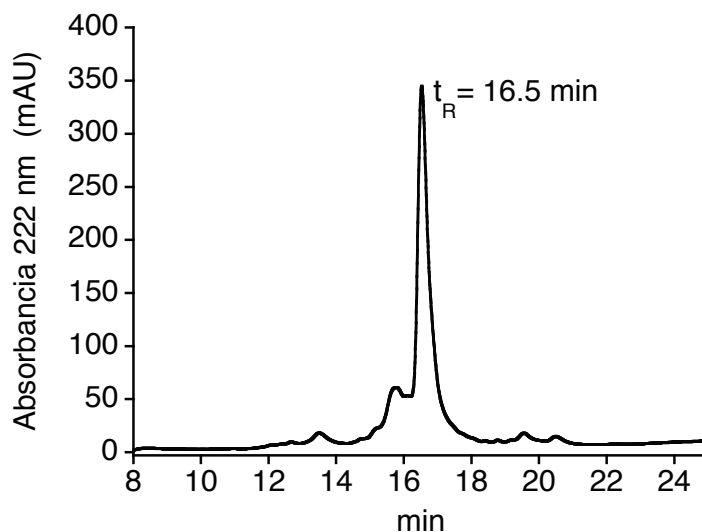
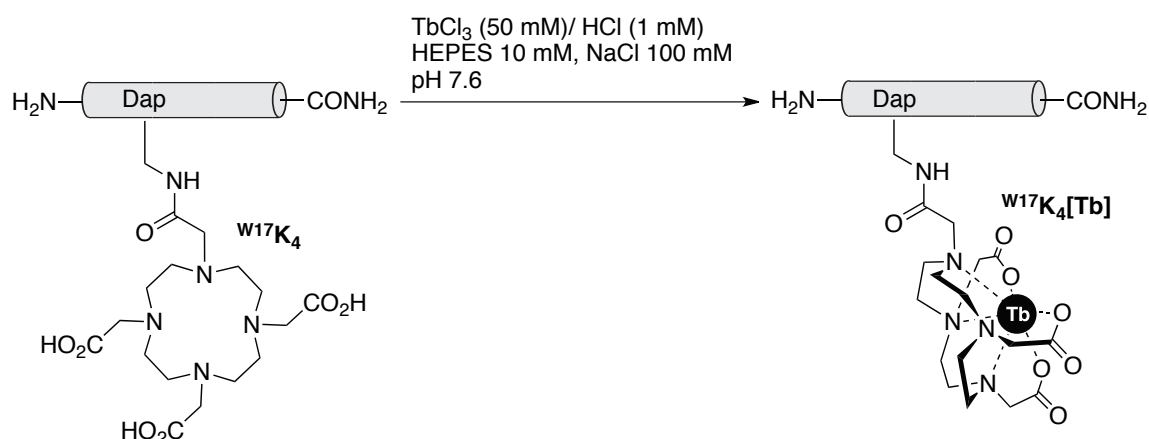


Figura 74. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 16.5 min corresponde al producto $^{w17}\mathbf{K}_4$ con el DOTA acoplado a la cadena lateral.

Habiéndose comprobado la naturaleza del producto mediante ESI-MS, se desprotegió el extremo N-terminal en fase sólida utilizando para ello las condiciones estándar ya descritas de 20% piperidina en DMF. A continuación, se realizó la desprotección y ruptura del péptido de la resina utilizando el procedimiento estándar previamente descrito en condiciones ácidas y se precipitó el péptido en éter. Finalmente se procedió a la purificación del producto por HPLC en fase reversa.

Una vez aislado el péptido $^{w17}\mathbf{K}_4$ y con el fin de coordinar el Tb^{3+} , este se redisolvió en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6 y se añadió una disolución de TbCl_3 (50 mM) / HCl (1 mM).



Esquema 22. Formación del complejo peptídico de terbio ${}^{w17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$.

El crudo de reacción se analizó mediante HPLC-MS y se obtuvo el cromatograma que se muestra a continuación, en el que se observó un único pico correspondiente al complejo peptídico de terbio ${}^{w17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$, que se purificó mediante HPLC en fase reversa. El péptido se aisló como un sólido blanco con un rendimiento global para toda la síntesis del 18%.

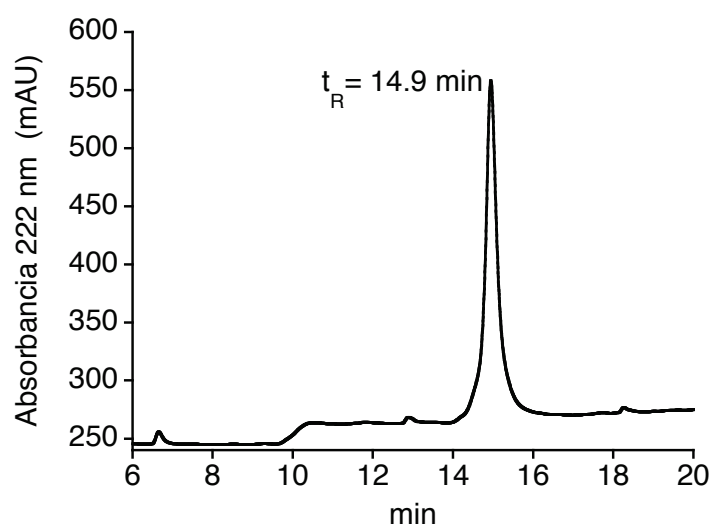
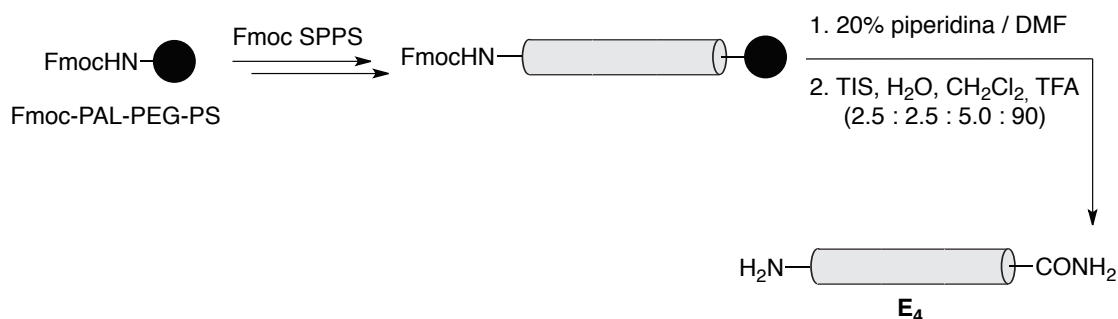


Figura 75. Cromatograma de HPLC del crudo de reacción en el que el pico de 14.9 min corresponde al producto deseado ${}^{w17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$.

Para la síntesis de los péptidos ${}^{w9}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$ y ${}^{w9/17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$ se siguieron procedimientos análogos a los descritos para el péptido ${}^{w17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$. Ambos péptidos se aislaron como sólidos blancos con un rendimiento aproximado del 23% para ${}^{w9}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$ y del 14% para ${}^{w9/17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$.

Síntesis de E₄

La síntesis del péptido E₄ se llevó a cabo siguiendo protocolos habituales de síntesis en fase sólida de acoplamiento (HBTU, DIEA/DMF) y desprotección de los aminoácidos (20% piperidina en DMF) que ya se han descrito anteriormente. En el extremo N-terminal se introdujo un residuo de Phe (F) para permitir la cuantificación del péptido mediante espectroscopía de UV. Se seleccionó este residuo puesto que presenta un coeficiente de extinción pequeño ($\epsilon_{258\text{nm}} = 195 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a una baja longitud de onda que no debería interferir en la irradiación del residuo de Trp para la transferencia ni podría sensibilizar al metal de forma efectiva.



Esquema 23. Síntesis del péptido E₄.

Una vez sintetizada la secuencia completa del péptido se desprotegió el extremo N-terminal en las condiciones estándar ya descritas. En el análisis de HPLC-MS de una pequeña porción de la resina se observó un pico mayoritario correspondiente al péptido deseado.

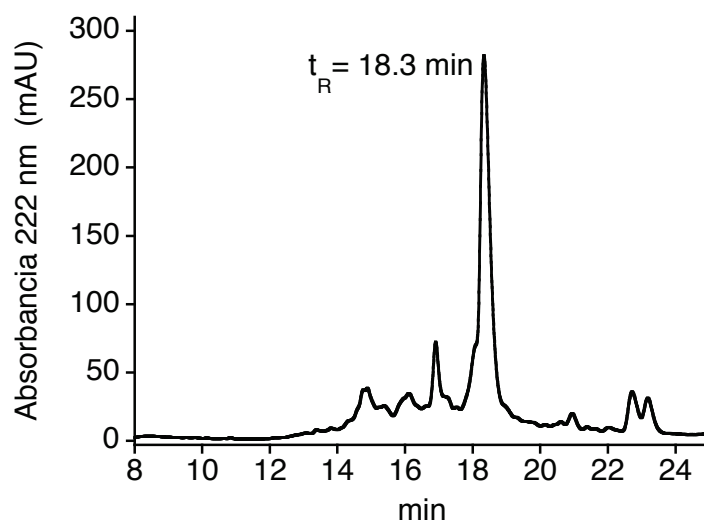


Figura 76. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 18.3 min corresponde al péptido **E₄** con el extremo N-terminal desprotegido.

Se procedió entonces a la desprotección y ruptura del péptido de la resina, posterior precipitación en éter y purificación del producto por HPLC en fase reversa, aislándose el péptido **E₄** como un sólido blanco con un rendimiento aproximado del 26%.

Ensayos de interacción de los derivados de K_4 con E_4

Ensayos de luminiscencia

Se realizaron ensayos de luminiscencia en estado estacionario de las disoluciones 1 μM de cada uno de los péptidos luminiscentes ${}^{\text{w}9}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$, ${}^{\text{w}17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$ y ${}^{\text{w}9/17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$, en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, y sus espectros de emisión se compararon con los que se obtuvieron para cada péptido en presencia de la secuencia complementaria E_4 .

Tal y como se muestra en la siguientes gráfica, el péptido ${}^{\text{w}9}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$ muestra un espectro en el que la intensidad de la emisión es moderada como monómero y permanece casi invariable cuando está presente un exceso de E_4 .

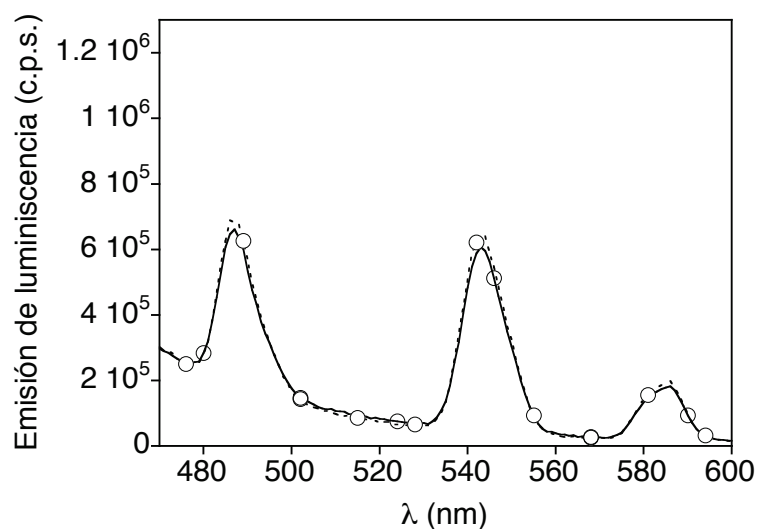


Figura 77. (○) Línea discontinua: espectro de luminiscencia del péptido ${}^{\text{w}9}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$ 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Línea continua: misma muestra en presencia de $E_4 \approx 20$ μM .

En contraste, el péptido ${}^{\text{w}17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$ presenta un espectro en el que la intensidad de la emisión es débil cuando se encuentra como monómero, pero la adición de E_4 provoca un aumento significativo en la intensidad de la emisión del complejo metálico de aproximadamente un 200%.

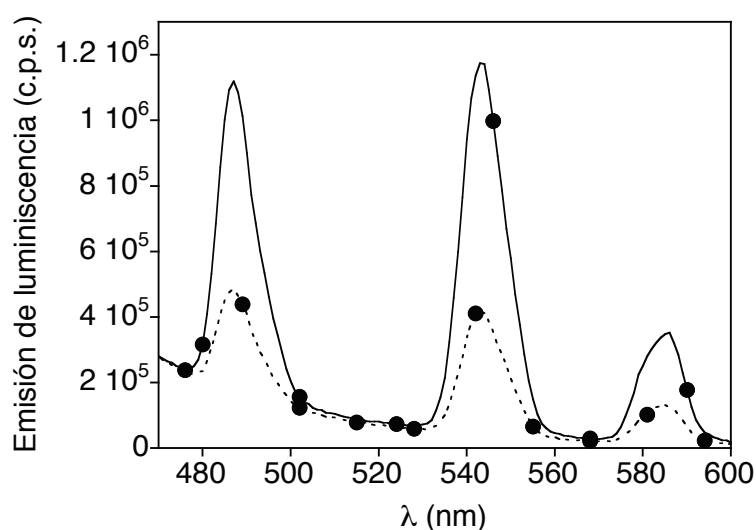


Figura 78. (●) Línea discontinua: espectro de luminiscencia del péptido $^{W17}K_4[Tb]$ 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{exc} = 280$ nm. Línea continua: misma muestra en presencia de $E_4 \approx 20 \mu M$.

Finalmente, en el caso del péptido $^{W9/17}K_4[Tb]$ se observó un comportamiento intermedio al de los otros dos péptidos. Este péptido presenta un espectro en el que la intensidad de la señal de emisión como monómero es similar a la de $^{W9}K_4[Tb]$, sin embargo, la intensidad de la emisión para la mezcla $^{W9/17}K_4[Tb]/E_4$ es intermedia a la de los otros dos complejos, mostrando un aumento en la intensidad de la emisión de aproximadamente un 50% respecto a la del monómero.

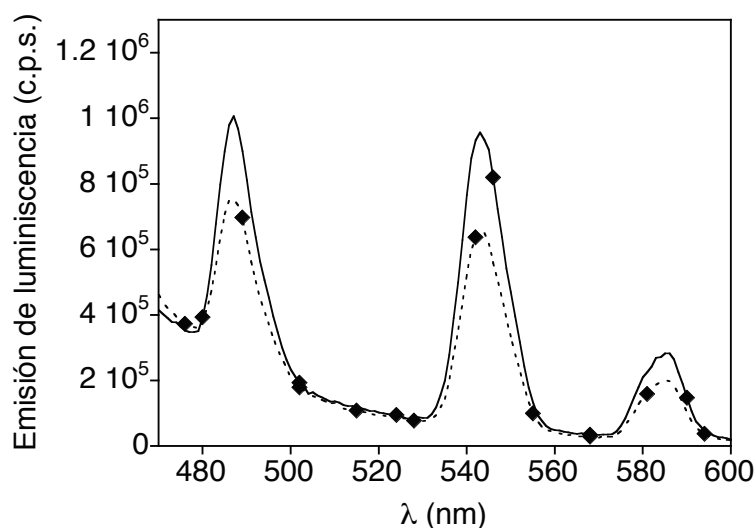


Figura 79. (◆) Línea discontinua: espectro de luminiscencia del péptido $^{W9/17}K_4[Tb]$ 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{exc} = 280$ nm. Línea continua: misma muestra en presencia de $E_4 \approx 20 \mu M$.

A continuación se muestra una comparación de la señal de emisión normalizada a 545 nm de los tres péptidos ${}^{\text{w}9}\mathbf{K}_4[\text{Tb}]$, ${}^{\text{w}17}\mathbf{K}_4[\text{Tb}]$ y ${}^{\text{w}9/17}\mathbf{K}_4[\text{Tb}]$ y de sus respectivos complejos con \mathbf{E}_4 .

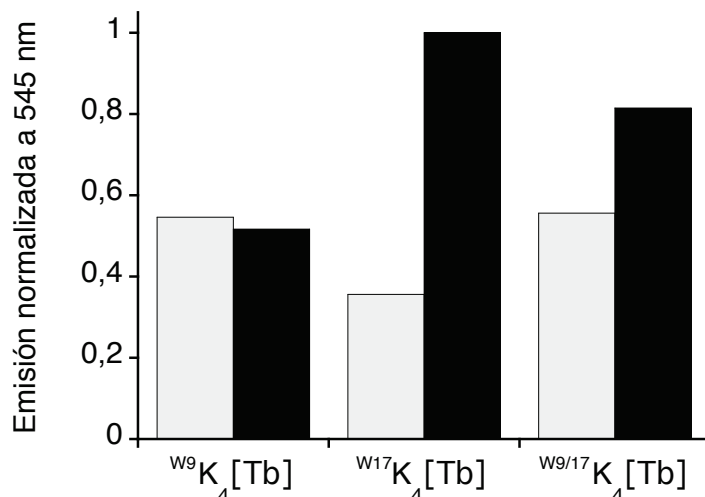


Figura 80. Barras grises: señal de luminiscencia normalizada a 545 nm de los péptidos monoméricos en concentración 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Barras negras: mismas muestras en presencia del péptido $\mathbf{E}_4 \approx 20$ μM .

Dado que el péptido ${}^{\text{w}17}\mathbf{K}_4[\text{Tb}]$ es el que presenta mejores propiedades, se decidió caracterizar más en profundidad su interacción con \mathbf{E}_4 . Para ello se realizó una valoración de luminiscencia en estado estacionario añadiendo alícuotas de una madre de \mathbf{E}_4 (500 μM) sobre una disolución 1 μM del péptido ${}^{\text{w}17}\mathbf{K}_4[\text{Tb}]$.

El ajuste de los datos de las valoraciones a un modelo de interacción 1:1 permitió calcular una $K_D \approx 3.3$ μM para el complejo ${}^{\text{w}17}\mathbf{K}_4[\text{Tb}]/\mathbf{E}_4$. Este valor contrasta con el obtenido para el sistema heterodimérico nativo de ≈ 116 nM ¹¹³ y sugiere que la introducción tanto del Trp como del residuo de Dap modificado tiene un efecto negativo en el plegamiento de la cadena polipeptídica que desestabiliza la formación del heterodímero.

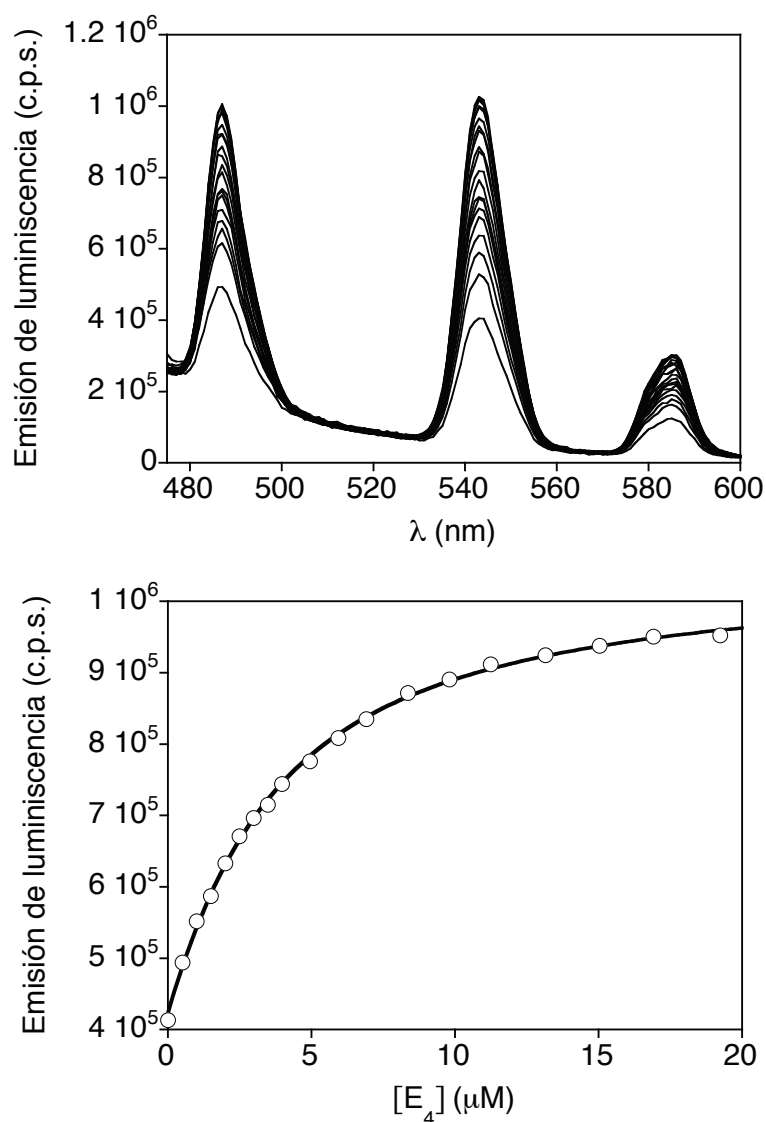


Figura 81. Arriba. Valoración de emisión en estado estacionario de $^{w17}K_4[Tb]$ 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{exc} = 280$ nm, en presencia de cantidades crecientes de E_4 . **Abajo.** Gráfica de emisión de luminiscencia a 545 nm frente a la concentración de E_4 y la mejor curva de ajuste de la unión.

Ensayos de dicroísmo circular

Con el fin de comprobar que el aumento en la señal de emisión del complejo metálico cuando se encuentra como especie dimérica se debe a la formación de una estructura helicoidal, se decidió realizar ensayos de dicroísmo circular para el sistema $^{w17}K_4[Tb]/E_4$.

Se midieron los espectros de dicroísmo circular de los péptidos $^{w17}K_4[Tb]$ y E_4 , con una concentración 5 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, y de una disolución conteniendo ambos péptidos en las mismas concentraciones.

La gráfica de dicroísmo circular que se muestra a continuación sugiere una estructura desordenada de los monómeros, tanto E_4 como $^{w17}K_4[Tb]$, en disolución. El aumento de helicidad observado a 222 nm en una disolución con cantidades equimolares de E_4 y $^{w17}K_4[Tb]$ es consistente con la formación del complejo heterodimérico $^{w17}K_4[Tb]/E_4$ donde cada péptido se pliega para formar una hélice α .

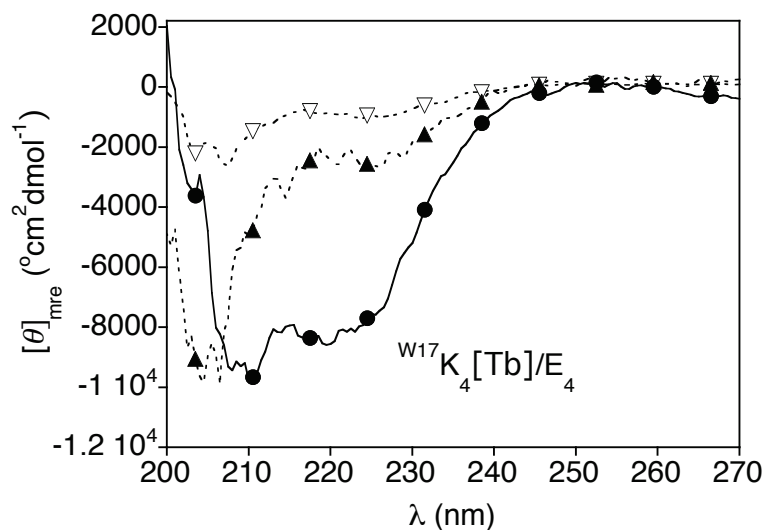


Figura 82. Líneas punteadas: espectro de dicroísmo circular de los péptidos E_4 (∇) y $^{w17}K_4[Tb]$ (\blacktriangle) en concentración $5 \mu M$ en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6. Línea continua: su complejo 1:1 (\bullet) en concentración $5 \mu M$.

Estos experimentos, consistentes con la formación de una estructura helicoidal después de la adición del péptido E_4 sobre $^{w17}K_4[Tb]$, confirman el mecanismo esperado de aumento de la emisión asociado con el acercamiento relativo del Trp dador y del DOTA[Tb³⁺] aceptor en los complejos coiled-coil.

Se decidió entonces utilizar este sistema modelo como base para el desarrollo de sensores de factores de transcripción naturales como es el factor de transcripción oncogénico c-Jun.

Diseño de sensores del factor de transcripción c-Jun

Como ya se ha comentado con anterioridad, el factor de transcripción c-Jun pertenece a la familia de los factores de transcripción bZip y, como tal, carece de estructura secundaria definida en su forma monomérica pero la dimerización con c-Fos, a través de las regiones de cremallera de leucinas, induce el plegamiento de ambas proteínas en hélices α estables formando así el complejo heterodimérico AP-1 que reconoce la secuencia de ADN 5'-TGA(C/G)TCA-3'.^{52,53,58}

Con el fin de detectar c-Jun y siguiendo la estrategia puesta a punto con el sistema modelo $\mathbf{K}_4/\mathbf{E}_4$, se diseñó un péptido basado en la cremallera de leucinas de c-Fos ($\mathbf{Fos}^{\mathbf{W}}[\mathbf{Tb}]$) que incorpora el residuo de Trp y el complejo de terbio en posiciones equivalentes a aquellas en las que se encuentran en el sistema modelo $^{\mathbf{W}17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]/\mathbf{E}_4$.

Además, se diseñó un segundo péptido, $\mathbf{A-Fos}^{\mathbf{W}}[\mathbf{Tb}]$, que incorpora una cola ácida, rica en residuos de Glu, en el extremo N-terminal de la secuencia de $\mathbf{Fos}^{\mathbf{W}}[\mathbf{Tb}]$. Esta extensión (EELEKEAEELEQEL), cargada negativamente, debería establecer interacciones electroestáticas favorables con la región básica de c-Jun, rica en residuos de Arg, proporcionando así la estabilización del complejo y un aumento en la afinidad por c-Jun.⁶⁴

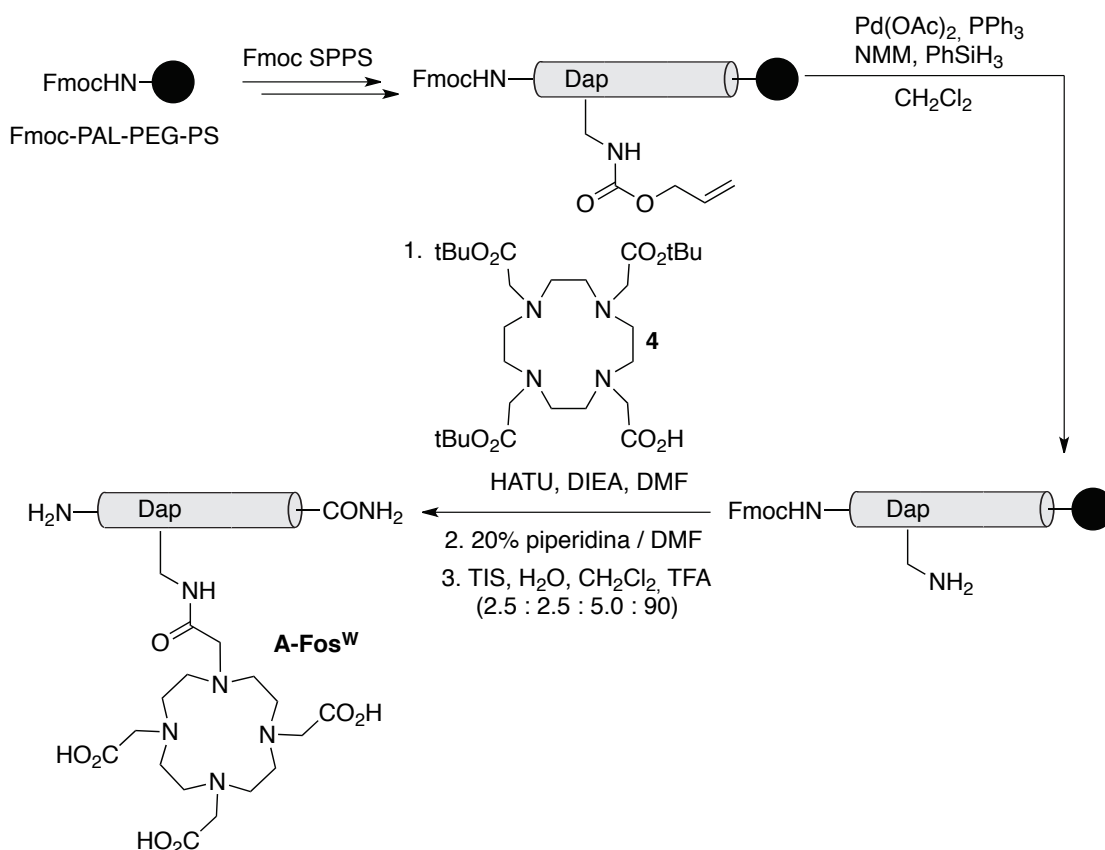
		H1	H2	H3	H4	H5
		abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcd
$\mathbf{Fos}^{\mathbf{W}}[\mathbf{Tb}]$:		LAELQAE	TDQLE ϕ E	KSWLQTE	IANLLKE	KEKL
$\mathbf{A-Fos}^{\mathbf{W}}[\mathbf{Tb}]$:	EELEKEAEELEQEL	LAELQAE	TDQLE ϕ E	KSWLQTE	IANLLKE	KEKL
c-Fos:	MKRRIRRRERKNMAAAKCRNRRREL	TDTLQAE	TDQLEDE	KSALQTE	IANLLKE	KEKLW
c-Jun:	FIKAERKMRNRRIAASKSRKRKLER	IARLEEK	VKTLKAQ	NSELAST	ANMLREQ	VAQLKQK VMNH

Síntesis de los péptidos

Síntesis de los péptidos basados en c-Fos

La síntesis de los derivados de c-Fos se planteó siguiendo una derivatización ortogonal en fase sólida, similar a las descritas anteriormente y basadas en la modificación en fase sólida de los péptidos desprotegidos ortogonalmente en la cadena de un residuo de Dap(alloc) introducido para la conjugación del ligando macrocíclico DOTA.

La eliminación del grupo alloc de la cadena lateral del residuo de Dap del péptido **A-Fos^W** se llevó a cabo según las condiciones ya descritas. Posteriormente, se acopló el ligando quelatante **4** utilizando HATU en presencia de DIEA en DMF.



Esquema 24. Síntesis del péptido **A-Fos^W**.

El resultado de la síntesis se analizó por HPLC-MS, obteniéndose el cromatograma que se muestra a continuación en el que se observó un pico mayoritario correspondiente al producto deseado **A-Fos^W** con el extremo N-terminal protegido con el grupo Fmoc.

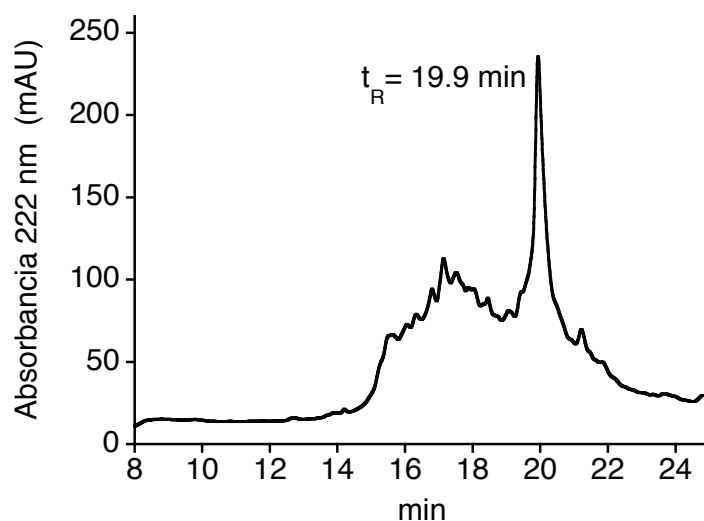
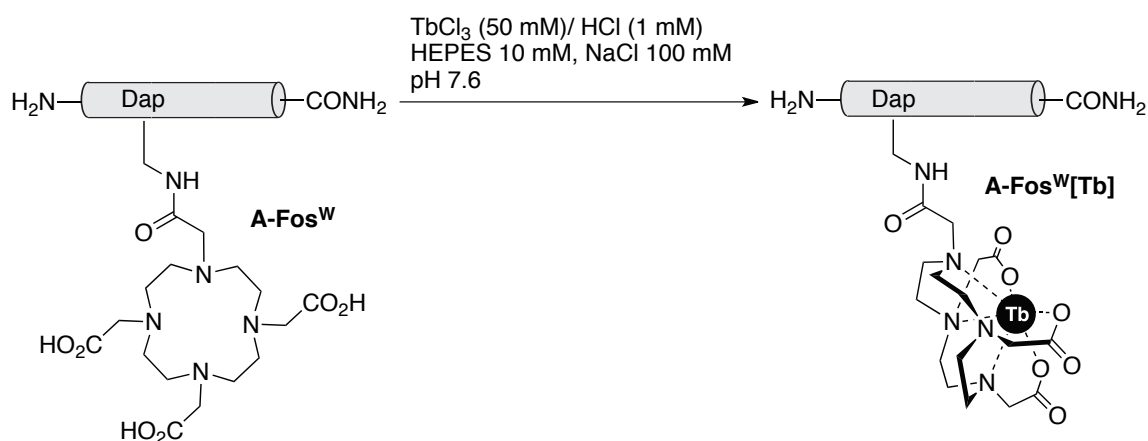


Figura 83. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 19.9 min corresponde al péptido **A-Fos^W**.

El extremo N-terminal se desprotegió en fase sólida utilizando las condiciones estándar ya descritas. El péptido se desprotegió y liberó de la resina utilizando el procedimiento habitual y se precipitó en éter, procediéndose finalmente a la purificación del producto por HPLC en fase reversa.

Después de liofilizar, **A-Fos^W** se redisolvió en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6 y se añadió una disolución de TbCl₃ (50 mM) / HCl (1 mM) para formar el complejo de terbio **A-Fos^W[Tb]**.



Esquema 25. Formación del complejo peptídico de terbio **A-Fos^W[Tb]**.

El crudo de reacción se analizó mediante HPLC-MS y se obtuvo el cromatograma que se muestra a continuación, en el que se observó un único pico correspondiente al complejo peptídico de terbio que se purificó a continuación mediante HPLC en fase reversa. El péptido **A-Fos^W[Tb]** se aisló como un sólido blanco con un rendimiento global aproximado del 13%.

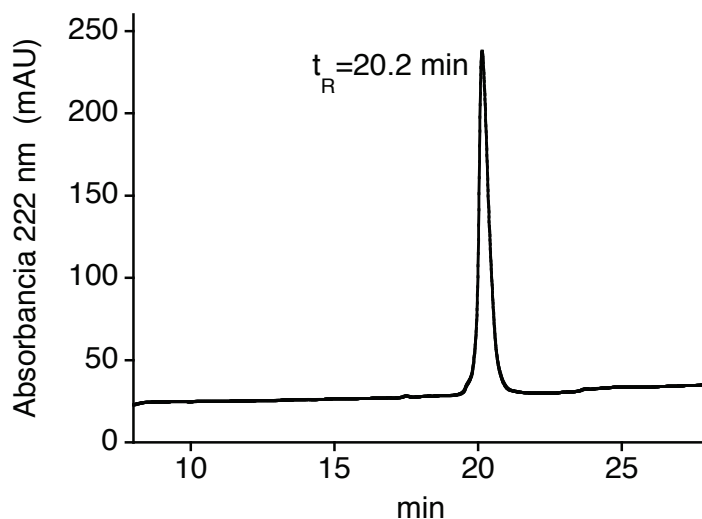
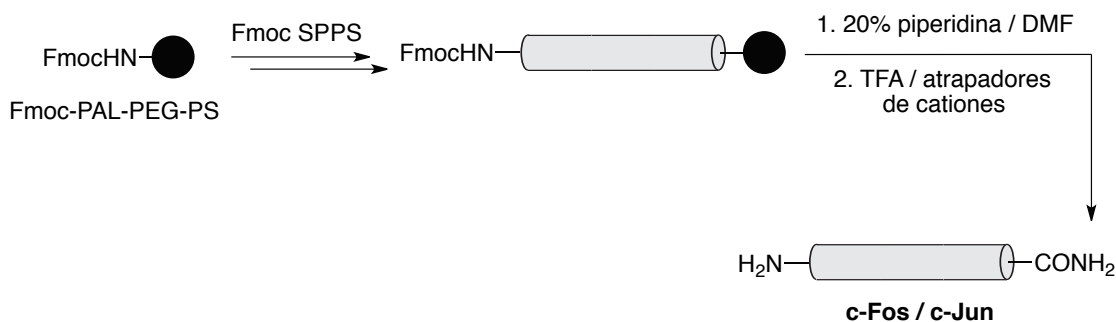


Figura 84. Cromatograma de HPLC del crudo de reacción en el que el pico de 20.2 min corresponde al complejo peptídico de terbio **A-Fos^W[Tb]**.

El péptido **Fos^W[Tb]** se sintetizó siguiendo procedimientos análogos a los descritos para **A-Fos^W[Tb]** y se aisló como un sólido blanco con un 19% de rendimiento.

Síntesis de c-Jun y c-Fos

La síntesis de los péptidos **c-Fos** y **c-Jun** se llevó a cabo en fase sólida siguiendo los protocolos estándar de síntesis en fase sólida de acoplamiento y desprotección de los aminoácidos que ya se han descrito anteriormente.



Esquema 26. Protocolo para la síntesis de **c-Fos** y **c-Jun**.

Una vez sintetizada la secuencia completa del péptido **c-Fos**, se analizó una pequeña porción de la resina mediante HPLC-MS obteniéndose un cromatograma en el que se observó un pico mayoritario correspondiente al péptido deseado.

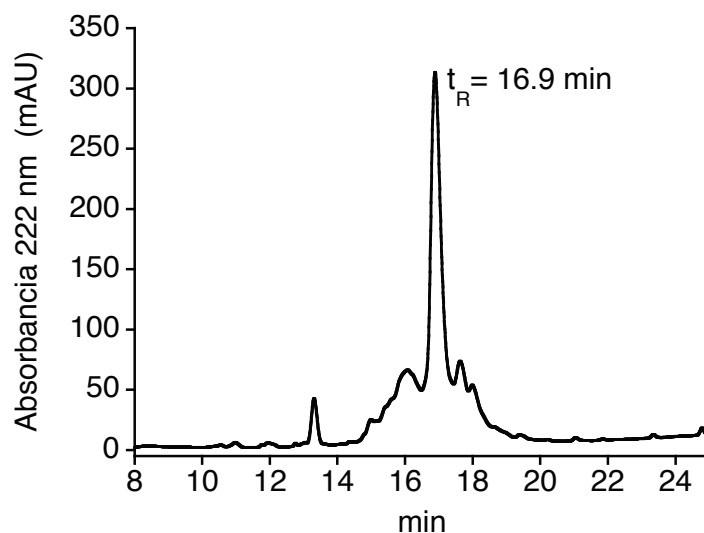


Figura 85. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 16.9 min corresponde al péptido **c-Fos** con el extremo N-terminal todavía protegido por el grupo Fmoc.

Se desprotegió entonces el extremo N-terminal en fase sólida en las condiciones estándar ya descritas. Para la desprotección y liberación del péptido, la resina se trata con la mezcla de desprotección con atrapadores de cationes (25 μ L EDT, 25 μ L H₂O, 10 μ L TIS, 940 μ L TFA) y el péptido se precipita en éter. Finalmente se procedió a la purificación del producto por HPLC en fase reversa y se liofilizó. El péptido **c-Fos** se aisló como un sólido blanco con un rendimiento aproximado del 24%.

El péptido **c-Jun** se intentó sintetizar en fase sólida de forma análoga a **c-Fos** pero en este caso, y a pesar de probar diversas condiciones de reacción, agentes de acoplamiento y modificaciones del procedimiento estándar, se obtuvo una mezcla compleja de productos que fue imposible separar por HPLC. Ante estas dificultades sintéticas, se optó por adquirir **c-Jun** a la casa comercial Eurogentec (Bélgica) quien la suministró unida al soporte sólido y con su extremo N-terminal protegido con Fmoc.

Esta resina se trató con piperidina para desproteger el extremo N-terminal y se le acopló un residuo de Phe para la posterior cuantificación mediante espectroscopía de UV. A continuación, se desprotegió una pequeña cantidad de

la resina para su análisis por HPLC-MS obteniéndose el cromatograma que se muestra a continuación, en el que se observa un pico mayoritario correspondiente al producto deseado con el extremo amino-terminal protegido con el grupo Fmoc.

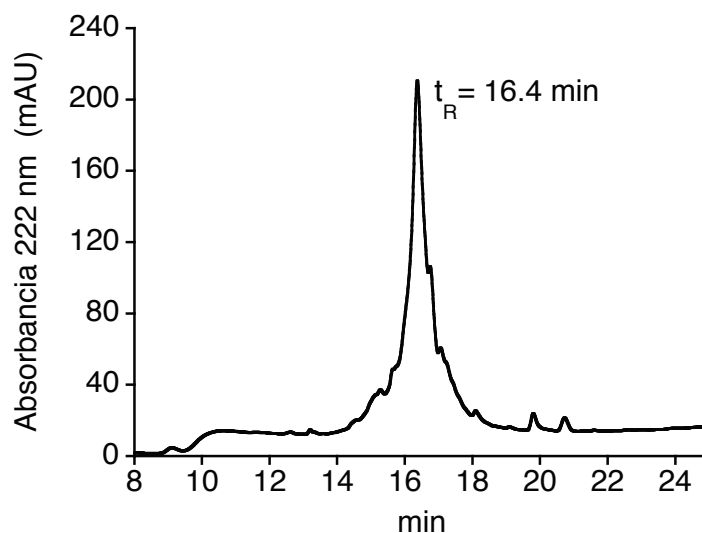


Figura 86. Cromatograma de HPLC correspondiente al residuo de la desprotección/ruptura de la resina en el que el pico de 16.4 min corresponde al péptido **c-Jun** con el extremo N-terminal todavía protegido por el grupo Fmoc.

Una vez comprobado el resultado, se desprotegió el extremo N-terminal en fase sólida en las condiciones estándar ya descritas y a continuación se procedió la desprotección y ruptura del péptido de la resina, utilizando una mezcla de desprotección alternativa a la habitual para evitar la oxidación de los residuos de metionina (20 μ L anisol, 30 μ L EDT, 50 μ L tioanisol, 900 μ L TFA), y su precipitación en éter. Finalmente el producto se purificó por HPLC en fase reversa y se liofilizó. El péptido **c-Jun** se aisló como un sólido blanco con un rendimiento aproximado del 28% considerando la carga de la resina.

Ensayos de interacción de los derivados con c-Jun

Ensayos de luminiscencia

Se realizaron ensayos de luminiscencia en estado estacionario de las disoluciones 1 μM de cada uno de los péptidos **Fos^W[Tb]** y **A-Fos^W[Tb]** en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, y sus espectros de emisión se compararon con los que se obtuvieron para cada péptido en presencia de **c-Jun**.

Tal y como se muestra en las siguientes gráficas, en estos sistemas se reproduce el comportamiento observado con los péptidos modelo, observándose un aumento en la señal de emisión como consecuencia de la formación de las especies diméricas.

Así, el péptido **Fos^W[Tb]** presenta un espectro en el que la intensidad de la emisión es débil cuando se encuentra como monómero, pero la adición de **c-Jun** provoca un aumento en la intensidad de la emisión del complejo metálico de un 150%. Este efecto es consistente con la formación del complejo **Fos^W[Tb]/c-Jun** y el plegamiento de las cremalleras de leucinas.

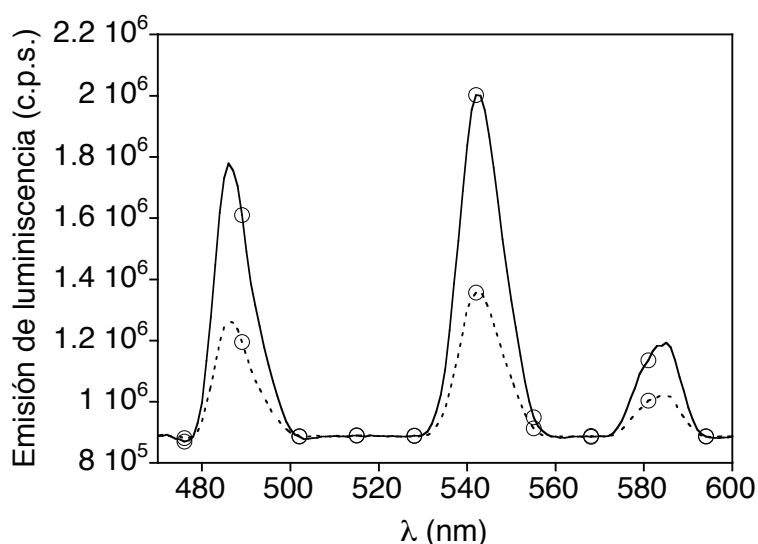


Figura 87. (○) Línea discontinua: espectro de luminiscencia del péptido **Fos^W[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Línea continua: misma muestra en presencia de **c-Jun** ≈ 9.2 μM .

Para el péptido **A-Fos^W[Tb]**, que presenta un espectro en el que la intensidad de la emisión también es débil cuando se encuentra aislado en disolución, la adición de **c-Jun** provoca un aumento en la intensidad de la emisión del complejo metálico de casi un 200%, también consistente con la formación del complejo **A-Fos^W[Tb]/c-Jun**.

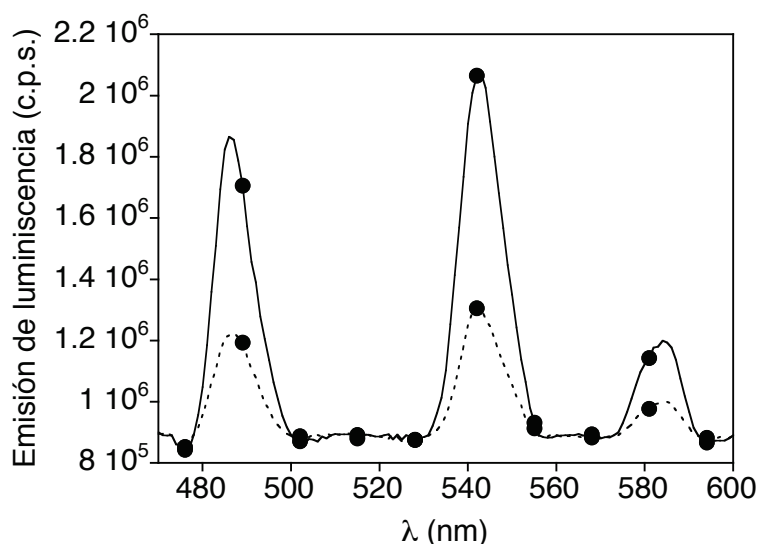


Figura 88. (●) Línea discontinua: espectro de luminiscencia del péptido **A-Fos^W[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Línea continua: misma muestra en presencia de **c-Jun** ≈ 3.8 μM .

Dado que ambos péptidos presentan propiedades de emisión similares, se decidió caracterizar más en profundidad la interacción entre ambos péptidos y **c-Jun**. Para ello, se realizaron valoraciones de luminiscencia en estado estacionario, añadiendo alícuotas de una madre de **c-Jun** (100 μM) sobre una disolución 1 μM de los péptidos.

Como se esperaba, la introducción de la cola ácida en **A-Fos^W[Tb]** hace que el péptido se una a **c-Jun** con mayor afinidad ($K_D \approx 349$ nM) que el derivado de la cremallera de leucinas **Fos^W[Tb]** ($K_D \approx 1.5$ μM), calculándose un límite de detección para **c-Jun** con el sensor **A-Fos^W[Tb]** de aproximadamente 42 nM.¹¹⁵

115 Armbruster, D. A.; Pry, T. Clin. Biochem. Rev. **2008**, 29, S49. Para el cálculo del límite de detección se mide 10 veces el espectro de emisión del sensor. Se considera que el valor medio de la intensidad de emisión a 545 nm de las 10 medidas más 2 veces su desviación estándar es la intensidad mínima que indica la presencia de **c-Jun**. La curva de valoración del sensor **A-Fos^W[Tb]** con **c-Jun** nos permite traducir ese valor en un valor de concentración mínima de c-Jun detectable, es decir, el límite de detección.

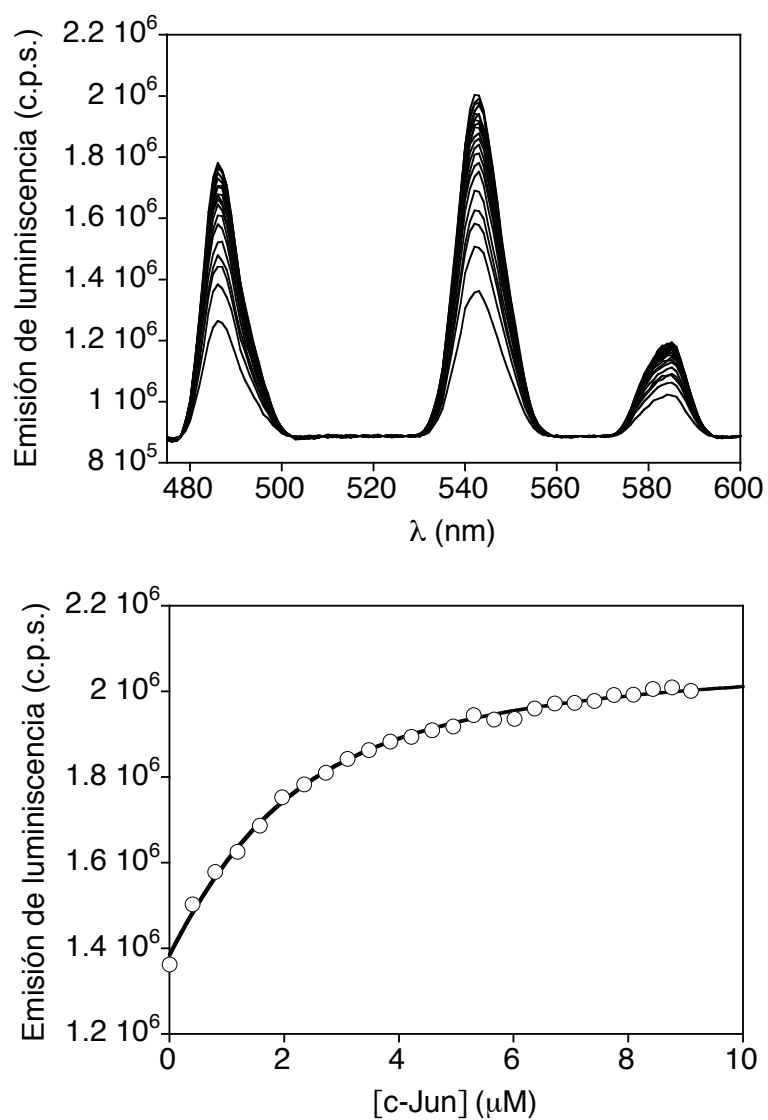


Figura 89. Arriba. Valoración de emisión en estado estacionario de Fos^W[Tb] 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{exc} = 280$ nm, en presencia de cantidades crecientes de c-Jun. **Abajo.** Gráfica de emisión de luminiscencia a 545 nm frente a la concentración de c-Jun y la mejor curva de ajuste de la unión.

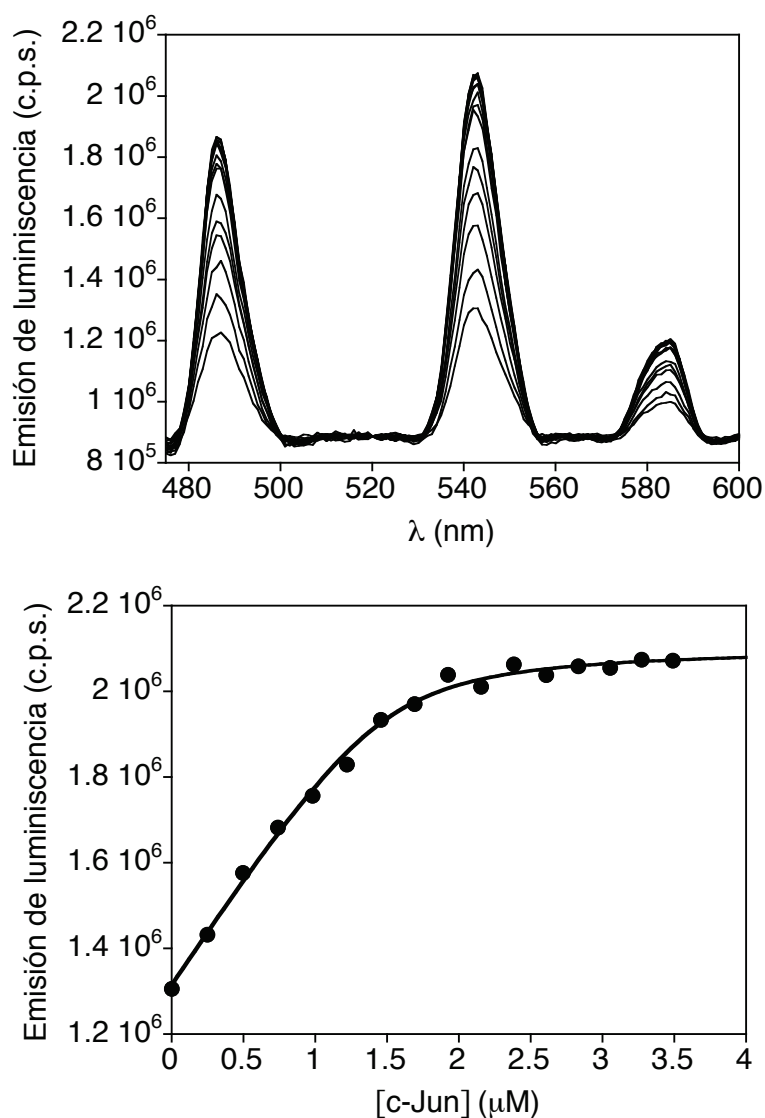


Figura 90. Arriba. Valoración de emisión en estado estacionario de **A-Fos^W[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{exc} = 280$ nm, en presencia de cantidades crecientes de **c-Jun**. **Abajo.** Gráfica de emisión de luminiscencia a 545 nm frente a la concentración de **c-Jun** y la mejor curva de ajuste de la unión.

Dado que **A-Fos^W[Tb]** es el péptido que presenta la unión de mayor afinidad a **c-Jun**, se decidió caracterizar en profundidad sus propiedades y llevar a cabo distintas pruebas para comprobar su especificidad por **c-Jun**. Para ello se realizaron ensayos luminiscentes en estado estacionario incubando **A-Fos^W[Tb]** con otros péptidos como **E₄** o **c-Fos** y en ningún caso se observó un cambio en la intensidad de la emisión de la sonda.

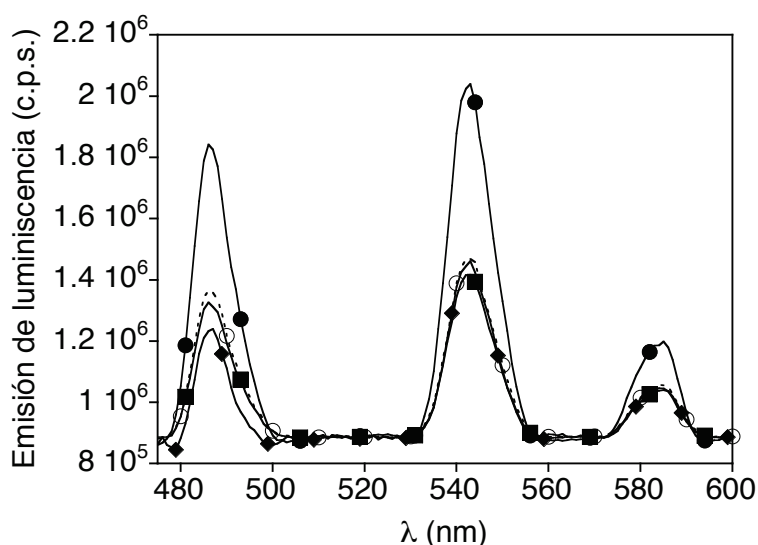


Figura 91. Línea discontinua: espectro de emisión del péptido **A-Fos^W[Tb]** 1 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, λ_{exc} = 280 nm, (○). Líneas continuas: misma muestra en presencia de 2 eq de **c-Jun** (●); 8 eq de **c-Fos** (◆) y 10 eq de **E₄** (■).

Por otra parte, también se encontró que la luminiscencia del complejo preformado al mezclar cantidades equimolares de **A-Fos^W[Tb]** y **c-Jun** permanece invariable cuando se añaden sobre este cantidades crecientes de **c-Fos**.

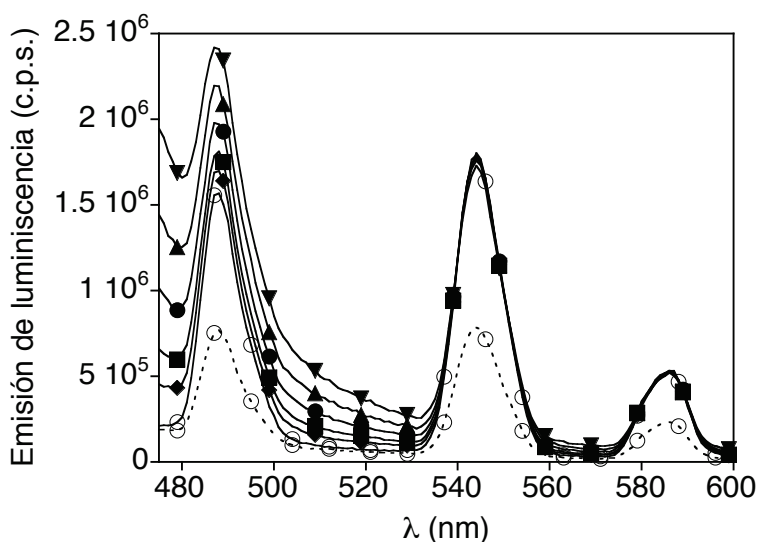


Figura 92. Línea discontinua: espectro de emisión del péptido **A-Fos^W[Tb]** 1 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, λ_{exc} = 280 nm, (○). Líneas continuas: misma muestra en presencia de 4 equivalentes de **c-Jun** (○); 1 equivalente (◆); 2 equivalentes (■); 4 equivalentes (●); 6 equivalentes (▲) y 10 equivalentes (▼) de **c-Fos**.

Además, también se realizaron ensayos en un medio complejo, como lo es el formado por extractos celulares, para probar el sistema en condiciones biológicamente relevantes. Para ello, se midió la emisión del péptido **A-Fos^W[Tb]** con cantidades crecientes de **c-Jun** en presencia de un lisado celular (con una concentración de proteína total de 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En estos experimentos se observó que la señal luminiscente permanecía baja aun en presencia de la gran cantidad de proteína no específica procedente del lisado y que el sensor **A-Fos^W[Tb]** presentaba una afinidad comparable ($K_D \approx 630 \text{ nM}$) a la observada en los ensayos con muestras puras de proteína, demostrándose así la especificidad y viabilidad de esta estrategia en condiciones más complejas.

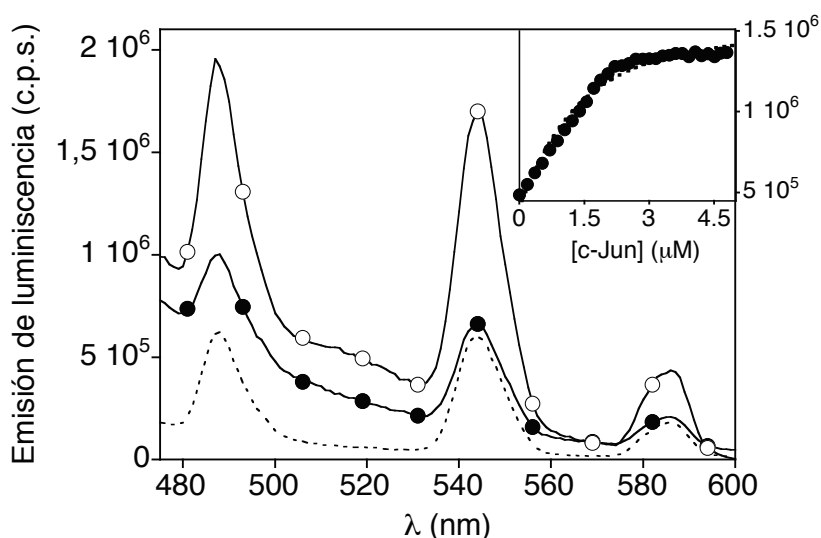


Figura 93. Línea discontinua: espectro de emisión del péptido **A-Fos^W[Tb]** 1 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$. Líneas continuas: (●) misma muestra en presencia de extractos celulares con una concentración de proteína total de 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (○) misma muestra en presencia de 4 eq de **c-Jun**. La gráfica insertada representa el aumento de emisión a 545 nm del péptido **A-Fos^W[Tb]** en presencia de cantidades crecientes de **c-Jun** y la mejor curva de ajuste de la unión.

Finalmente, al realizar experimentos de emisión de luminiscencia resuelta en el tiempo en lisados celulares, se observó que se eliminan las interferencias procedentes del fondo de fluorescencia típico de las muestras biológicas, demostrando así las ventajas de usar sensores basados en complejos de lantánidos al eliminar los problemas derivados de la autofluorescencia.

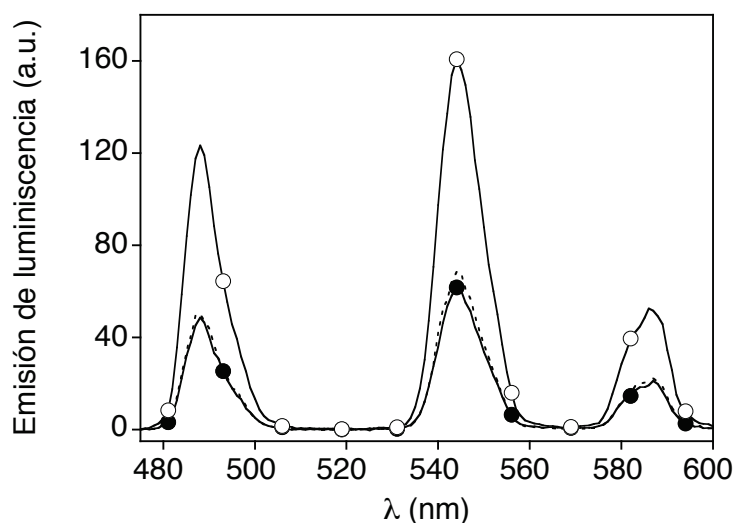


Figura 94. Línea discontinua: espectro de emisión de luminiscencia resuelta en el tiempo del péptido **A-Fos^W[Tb]** 1 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, λ_{exc} = 280 nm. Líneas continuas: (●) misma muestra en presencia de extractos celulares con una concentración de proteína total de 65 μ g/mL; (○) misma muestra en presencia de 4 eq de **c-Jun**.

Ensayos de dicroísmo circular

Finalmente, y con el fin de corroborar que el aumento en la señal de emisión del complejo metálico cuando se encuentra como especie dimérica se debe a la formación de una estructura helicoidal, se realizaron ensayos de dicroísmo circular para el sistema **A-Fos^W[Tb]/c-Jun**.

Por tanto, se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular de los péptidos **A-Fos^W[Tb]** y **c-Jun**, con una concentración 5 μ M en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, y de una disolución conteniendo ambos péptidos en las mismas concentraciones. La gráfica de dicroísmo circular que se muestra a continuación sugiere una estructura desordenada de los monómeros, tanto **c-Jun** como **A-Fos^W[Tb]**, en disolución. El aumento de helicidad observado a 222 nm en la disolución que contiene ambos péptidos es consistente con la formación de un complejo heterodimérico **A-Fos^W[Tb]/c-Jun** donde cada péptido se pliega para formar una hélice α .

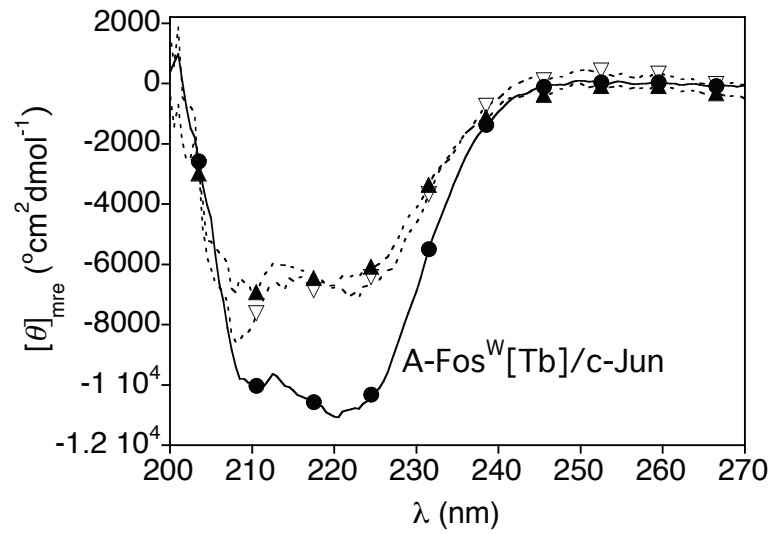


Figura 95. Líneas punteadas: espectro de dicroísmo circular de los péptidos **c-Jun** (∇) y **A-Fos^W[Tb]** (\blacktriangle) en concentración 5 μM en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6. Línea continua: su complejo 1:1 (\bullet) en concentración 5 μM .

En resumen, los resultados conjuntos de luminiscencia y dicroísmo circular apoyan el mecanismo esperado de aumento de la emisión asociado con la aproximación del Trp dador y del DOTA[Tb³⁺] receptor en los complejos coiled-coil.

Conclusiones

Se han desarrollado los péptidos **Fos^W[Tb]** y **A-Fos^W[Tb]** que experimentan un aumento de su emisión luminiscente en presencia del dominio de unión al ADN de la oncoproteína c-Jun. El diseño se basa en cremalleras de leucinas modificadas que incorporan el complejo de lantánido DOTA[Tb³⁺] y un residuo de Trp dador en la misma cadena peptídica. La formación de los heterodímeros con c-Jun y su plegamiento en una conformación de hélice α produce un aumento en la señal de emisión.

Se ha comprobado que el péptido **A-Fos^W[Tb]** interacciona selectivamente con **c-Jun** incluso en medios biológicos complejos como lisados celulares, en donde la aplicación de técnicas de luminiscencia resuelta en el tiempo permite eliminar las interferencias de emisión intrínseca típicas en estos casos.¹¹⁶

116 Los resultados de este trabajo han sido publicados en: Pazos, E.; Jiménez-Balsa, A.; Mascareñas, J. L.; Vázquez, M. E. *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1984.

Conclusiones

A lo largo de esta tesis se han estudiado diversas aproximaciones para la obtención de sensores luminiscentes de proteínas implicadas en cáncer.

Se han diseñado sensores basados en cambios de polaridad que presentan un aumento significativo en su emisión fluorescente en respuesta a la ciclina A. A lo largo de este estudio encontramos que la respuesta fluorescente es extremadamente dependiente de la naturaleza y la colocación del fluoróforo solvatocrómico en la secuencia peptídica. Desafortunadamente, estos parámetros son difíciles de predecir y por lo tanto la aplicación de esta estrategia implica una aproximación ensayo-error para la optimización de los sensores.

Por otra parte, se han desarrollado nuevas estrategias para la obtención de sensores luminiscentes de ciclina A basados en complejos de Tb(III). Se ha demostrado que es posible aprovechar la sensibilización intermolecular para obtener de forma sencilla biosensores altamente específicos. A diferencia de la estrategia basada en los fluoróforos solvatocrómicos, la funcionalidad quelatante que incorpora el ión metálico no tiene que interaccionar íntimamente con la proteína objetivo, sino que es suficiente con que se encuentre relativamente cerca del residuo sensibilizador, lo cual simplifica enormemente el diseño. Esta estrategia ha sido utilizada posteriormente por otros grupos de investigación para el desarrollo de sensores dirigidos a otras biomoléculas relevantes.¹¹⁷

Igualmente, se ha demostrado que es posible aprovechar los cambios en el entorno de coordinación de estos iones (específicamente el número de aguas en la primera esfera de coordinación) para modular la eficiencia de su luminiscencia.

Se han aprovechado los cambios conformaciones acoplados a procesos de reconocimiento para obtener sondas para detectar de forma selectiva la oncoproteína c-Jun. Esta estrategia de modulación de la luminiscencia, basada en el plegamiento de cadenas peptídicas, podría tener relevancia para la obtención de sensores dirigidos a un gran número de proteínas

117 a) Davies, C. L.; Housden, N. G.; Duhme-Klair, A.-K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8856. b) Hirayama, T.; Taki, M.; Kodan, A.; Kato, H.; Yamamoto, Y. *Chem. Commun.* **2009**, 3196.

intrínsecamente desestructuradas, que son cada vez más estudiadas por su papel fundamental en numerosos procesos biológicos.¹¹⁸

Es de esperar que alguna de las estrategias que hemos diseñado y desarrollado pueda extenderse para detectar otro tipo de biomoléculas y marcadores biológicos.

118 a) Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 54. b) Tompa, P. *FEBS Lett.* **2005**, 579, 3346. c) Gsponer, J.; Babu, M. M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2009**, 99, 94.

Parte experimental

Metodología de trabajo

Las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de Ar (Ar C-50, pureza mínima 99.999%), utilizando agitación magnética. Los disolventes se secaron cuando fue requerido por destilación bajo atmósfera de Ar sobre el agente de secado adecuado siguiendo los procedimientos descritos por Perrin.¹¹⁹

La eliminación de los disolventes a presión reducida se llevó a cabo en un rotavapor Büchi R-210 compuesto por un baño termostatzado B-491, un regulador de vacío V-850 y una bomba de vacío V-700. El secado de los disolventes después de las extracciones se realizó con Na₂SO₄ anhidro.

El seguimiento de las reacciones se hizo mediante cromatografía en capa fina utilizándose cromatofolios de gel de sílice de tipo 60 F254 de un espesor de capa de 0.2 mm sobre soporte de aluminio (Merck). El análisis de la capa fina se llevó a cabo utilizando luz UV a 254 nm y mediante revelado con calor de los cromatofolios previamente tratados con una disolución de ninhidrina al 2% en etanol.

La purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60 SDS, 230-400 mesh (Merck) y empleando como eluyentes mezclas de MeOH/CH₂Cl₂ o mediante un sistema de purificación preparativo Büchi Sepacore, consistente en un controlador C-615, dos módulos de bomba C-605 para gradientes binarios de disolventes, un colector de fracciones C-660 y un fotómetro de UV C-635, utilizando como eluyentes mezclas de MeOH, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Mercury 300 o Varian Inova 500. Los desplazamientos químicos están dados en ppm respecto a la señal del TMS y las constantes de acoplamiento en Hz.

Los espectros de masas de ESI se realizaron en un espectrómetro Bruker Microtof.

Para la síntesis de péptidos, los aminoácidos utilizados, los reactivos de acoplamiento y la resina provienen de las casas comerciales Bachem, Novabiochem, GL Biochem (Shangai) y Applied Biosystems. c-Jun se compró a Eurogentec (Bélgica) unida al soporte sólido.

119 Perrin, D., Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3 ed.; Pergamon Press: Oxford, 1988.

Los péptidos se sintetizaron manualmente o con un sintetizador de péptidos automático de *Protein Technologies PS3 Peptide Synthesizer*. En este último caso, los aminoácidos se acoplaron usando HBTU como agente de acoplamiento y cada aminoácido se activó durante 30 segundos en DMF antes de ser añadido a la resina. Una vez se añadió el aminoácido activado sobre la resina, los acoplamientos se llevaron a cabo durante 30 o 45 min. La desprotección del grupo protector temporal Fmoc se llevó a cabo con piperidina al 20% en DMF durante 10 min.

Para la centrifugación de las muestras se utilizó una microcentrífuga *Eppendorf 5415C* o una centrífuga *Eppendorf 5430*, ambas no refrigeradas.

Las medidas de pH se realizaron en un pHmetro *InoLab pH Level 2*.

El agua empleada se utilizó desionizada y purificada en un sistema *Millipore Milli-Q RG*.

La cromatografía de HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo *Agilent Serie 1100*. Para las inyecciones analíticas se utilizó una columna analítica *Zorbax Eclipse XDB-C₈* (5 μ m) 4.6 \times 150 mm de *Agilent*. La detección se llevó a cabo simultáneamente a 222 nm y 280 nm (y a 395 nm para los péptidos que contienen el fluoróforo 4-DMAP). La espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) se llevó a cabo en un espectrómetro *Agilent LC/MSD modelo VL G1956A* en modo positivo. Para la purificación de los péptidos se utilizó una columna semipreparativa *Jupiter Proteo 90A* (4 μ m), 10 \times 250 mm de *Phenomenex*. El gradiente estándar usado para las inyecciones tanto analíticas como semipreparativas fue de 15 \rightarrow 95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min.

Las liofilizaciones se llevaron a cabo en un liofilizador *ThermoSavant Modulyo D* acoplado a una bomba *Edwards RV3* de alto vacío.

Las estructuras de rayos X utilizadas para la construcción de modelos se obtuvieron del servidor del *Protein Data Bank*.¹²⁰ Los modelos se construyeron con el programa *PyMol* (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.*).

120 La dirección del *Protein Data Bank* es www.rcsb.org/pdb.

Las medidas de UV se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 100 Bio usando una semi-micro cubeta estándar Hellma (140.002-QS). Las concentraciones se midieron utilizando los siguientes coeficientes de extinción: $195 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 258 nm para Phe, $5579 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 278 nm para Trp,¹²¹ $6480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 421 nm para 4-DMAP y $17400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 475 nm para NBD.

Las medidas de emisión de luminiscencia en estado estacionario se realizaron en un Jobin-Yvon Fluoromax-3, (DataMax 2.20), acoplado a un controlador de temperatura Wavelength Electronics LFI-3751. Todas las medidas se realizaron a 20 °C en una ultra-micro cubeta Hellma (105.250-QS), para los sensores de ciclina, o en una semi-micro cubeta Hellma (114F-QS), para los demás sensores, utilizando los siguientes parámetros:

Sensores de proteína quinasa C: longitud de onda de excitación 280 nm; ancho de banda en el slit de excitación 4.0 nm; ancho de banda en el slit de emisión 5.0 nm; incremento 1.0 nm; tiempo de integración 0.2 s. El espectro de emisión fue recogido entre 450 y 600 nm con un filtro de 370 nm de paso largo para evitar la interferencia del armónico de la longitud de onda de excitación en el espectro.

Sensores de ciclina A basados en complejos de Tb(III): longitud de onda de excitación 280 nm; ancho de banda en el slit de excitación 4.0 nm; ancho de banda en el slit de emisión 7.0 nm; incremento 1.0 nm; tiempo de integración 0.5 s. El espectro de emisión fue recogido entre 450 y 600 nm con un filtro de 370 nm de paso largo.

Sensores solvatocrómicos de ciclina A: longitud de onda de excitación: 395 nm para 4-DMAP y 478 nm para NBD; ancho de banda en el slit de excitación 5.0 nm; ancho de banda en el slit de emisión 10.0 nm; incremento 1.0 nm; tiempo de integración 0.2 s. El espectro de emisión fue recogido entre 430 y 700 nm para 4-DMAP y de 500 a 650 nm para NBD.

Sensores de cremalleras de leucinas y del factor de transcripción c-Jun: longitud de onda de excitación 280 nm; ancho de banda en el slit de excitación 4.0 nm; ancho de banda en el slit de emisión 5.0 nm; incremento 1.0 nm; tiempo de integración 0.2 s. El espectro de emisión fue recogido entre 450 y 600 nm con un filtro de 370 nm de paso largo.

121 Fasman, G. D. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Proteins, I*, 3 ed.; CRC Press, 1976: pp 183–203.

Las medidas de emisión de luminiscencia resuelta en el tiempo se realizaron en un espectrofotómetro *Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer*. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente en una semi-micro cubeta *Hellma* (114F-QS), utilizando los siguientes parámetros: longitud de onda de excitación 280 nm; ancho de banda en el slit de excitación 20.0 nm; ancho de banda en el slit de emisión 5.0 nm; incremento 1.0 nm; tiempo medio 0.05 s; tiempo total de decaimiento 0.02 s; tiempo de espera 0.2 ms; voltaje del detector PMT 800 v. El espectro de emisión fue recogido entre 450 y 600 nm.

Para las medidas de los tiempos de vida del terbio se utilizaron los siguientes parámetros: longitud de onda de excitación 280 nm; longitud de onda de emisión 545 nm; ancho de banda en el slit de excitación 20.0 nm; ancho de banda en el slit de emisión 10.0 nm; tiempo total de decaimiento 15 ms; tiempo de espera 0.05 ms; voltaje del detector PMT 800 v.

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un *Jasco J-715* acoplado a un baño de agua termostatzado *Neslab RTE-111* con una macro cubeta *Hellma* (100-QS de 2 mm de paso óptico) a 20 °C. Los parámetros utilizados en la medida de las muestras fueron los siguientes: rango de adquisición 300-190 nm; ancho de banda 10.0 nm; resolución 0.5 nm; acumulación 4 barridos; sensibilidad 100 miligrados; tiempo de respuesta 1 s; velocidad 100 nm/min. Los espectros se suavizaron ligeramente para su mejor visualización utilizando la macro “smooth” implementada en el programa *KaleidaGraph* (versión 4.1 de *Synergy Software*).

Protocolo General de SPPS

A continuación se detallan los procedimientos generales seguidos para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

Reactivos y disolventes utilizados

Para la síntesis de péptidos se utilizó DMF de grado de síntesis de péptidos. Las disoluciones empleadas se prepararon al inicio de cada síntesis.

HBTU/HOBt/DMF: Se mezclan 3.8 g de HBTU y 1.35 g de HOBt en 50 mL de DMF (concentraciones finales de la disolución 0.2 M HBTU, 0.2 M HOBt).

DIEA/DMF: 3 mL de DIEA en 90 mL de DMF (0.195 M DIEA).

Preparación de la resina

En todas las síntesis en fase sólida se utilizó como soporte sólido la resina PAL-PEG-PS de Applied Biosystems con carga de 0.21 mmol/g.

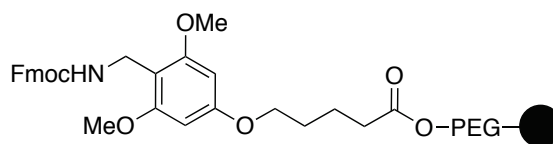


Figura 96. Estructura de la resina PAL-PEG-PS.

El procedimiento seguido para preparar la resina para iniciar la síntesis de péptidos en fase sólida es el siguiente:

- Añadir la resina (0.05 mmol) al matraz de reacción y lavarla con DMF (5 mL \times 10 min).
- Comprobar que el test de TNBS es negativo.
- Desproteger la resina: 20% piperidina en DMF (5 mL \times 20 min).
- Lavar con DMF (3 \times 5 mL \times 5 min).
- Comprobar que el test de TNBS es positivo.

Completada la secuencia, la resina está lista para acoplar el primer aminoácido. El proceso de la síntesis se detalla a continuación.

Proceso sintético

Acoplamiento: Se disuelve el aminoácido correspondiente (0.2 mmol, 4 eq) en HBTU/HOBt/DMF (1 mL, 4 eq) y DIEA/DMF (1.5 mL, 6 eq) y después de 2 min de activación se añade la mezcla sobre la resina. La suspensión resultante se agita durante 30 min con una corriente de N₂.

Lavados: Se realizan lavados después de cada acoplamiento con DMF (2 \times 5 mL \times 3 min).

Una vez lavada la resina se lleva a cabo el test de TNBS para comprobar como transcurrió el acoplamiento. Si es negativo se puede proceder al siguiente aminoácido, en caso de dar positivo se repite el acoplamiento.

Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc): Se lleva a cabo por tratamiento básico con 20% piperidina en DMF durante 20 min. A continuación se lava la resina desprotegida con DMF (4 × 5 mL × 2 min).

Ruptura de la unión del péptido con la resina y desprotección total: La ruptura de la unión del péptido con la resina y desprotección de las cadenas laterales se lleva a cabo utilizando distintas mezclas según la naturaleza del péptido unido a la resina:¹²²

- 25 µL TIS, 25 µL H₂O, 50 µL CH₂Cl₂, 900 µL TFA.
- 10 µL TIS, 25 µL EDT, 25 µL H₂O, 940 µL TFA.
- 20 µL anisol, 30 µL EDT, 50 µL tioanisol, 900 µL TFA.

Se añade 1 mL de disolución por cada 40 mg de resina. La mezcla resultante se agita durante 2 h. La suspensión se filtra para separar la resina de la mezcla de desprotección y se lava la resina con TFA (200 µL aproximadamente). Los filtrados combinados se añaden lentamente sobre Et₂O (10 mL éter por cada mL de disolución de ruptura empleada) previamente enfriado con CO₂ sólido y la suspensión del péptido en Et₂O se centrifuga a 7500 r.p.m. durante 10 min. A continuación se separa el líquido sobrenadante del sólido centrifugado y el sólido separado se suspende en Et₂O (5 mL) y se centrifuga de nuevo. El sólido obtenido se seca bajo una corriente de Ar y está listo para su análisis o purificación por HPLC.

Test TNBS: El test TNBS se utiliza para detectar aminas primarias libres en la resina, sirviendo para determinar el grado de incorporación de los aminoácidos acoplados.¹²³ TNBS es el acrónimo de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico y reacciona con aminas primarias formándose una sulfonamida de color rojo intenso.

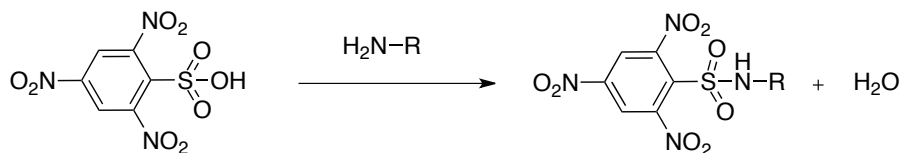


Figura 97. Condensación entre el TNBS y una amina primaria para formar una sulfonamida.

122 Chan, W. C., White, P. D., Eds. Basic procedures. Fmoc solid phase peptide synthesis. A practical approach; Oxford University Press: New York, 2000; pp 41-76.

123 Hancock, W. S.; Battersby, J. E. *Anal. Biochem.* **1976**, 71, 260.

Para realizar el test se coge una pequeña alícuota de la resina y se adiciona una gota de una disolución de DIEA (10% en DMF) y otra gota de una disolución de TNBS (1% en DMF). La suspensión se deja reposar durante unos 5 min y se observa el color que adquiere la resina.

Si la resina toma un color rojo intenso el test es positivo, lo que significa que hay aminas libres en la resina. Si por el contrario la resina no se colorea, el test es negativo y es indicativo de que no hay aminas libres en la resina.

Determinación de la concentración de las disoluciones de los péptidos y de ciclina A

La determinación de las concentraciones de las disoluciones utilizadas en los experimentos de fluorescencia y dicroísmo circular se llevó a cabo mediante espectroscopia de UV, utilizando como cromóforo de coeficiente de extinción conocido: la Phe ($\epsilon_{258\text{nm}} = 195 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para los péptidos **C1**, **C3[Tb]**, **C4[Tb]**, **C5[Tb]**, **C6**, **I1**, **I2**, **I3**, **E₄** y **c-Jun**; el Trp ($\epsilon_{278\text{nm}} = 5579 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para los péptidos **K2D**, **^PK2D**, **K2E**, **^PK2E**, **C2**, **^{W9}K₄[Tb]**, **^{W17}K₄[Tb]**, **Fos^W[Tb]**, **A-Fos^W[Tb]** y **c-Fos**, y ($\epsilon_{278\text{nm}} = 11158 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para **^{W9/17}K₄[Tb]**; el 4-DMAP ($\epsilon_{421\text{nm}} = 6480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para los péptidos **C7a**, **C8a**, **C9a**, **C10a**, **C11a**, **C12a** y **C13a**; y el NBD ($\epsilon_{475\text{nm}} = 17400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para los péptidos **C7b**, **C8b**, **C9b** y **C10b**. Para ciclina A se usó como coeficiente de extinción $\epsilon_{280\text{nm}} = 41830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para ello se tomaron 600 μL de una disolución de HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6, se añadieron distintos volúmenes de la disolución madre de cada uno de los péptidos y se midió la absorbancia a la correspondiente longitud de onda.

La concentración de la disolución madre se relaciona con las absorbancias obtenidas a través de la siguiente fórmula derivada de la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon \ell C$):

$$C_m = A \times \frac{600 + v}{(\epsilon \times v \times \ell)}$$

Donde A es la absorbancia de cada disolución, ϵ es el coeficiente de extinción para el cromóforo utilizado, ℓ es el paso óptico de la cubeta (1 cm en todos los casos), v es el volumen añadido en cada caso, y C_m es la concentración de la disolución madre.

Determinación de las constantes de disociación a partir de datos espectroscópicos

Los datos experimentales de las valoraciones luminiscentes de los péptidos **C3[Tb]**, **C10a** y **C11a** con ciclina A; de $^{17}\text{K}_4[\text{Tb}]$ con **E₄**; y de **Fos^W[Tb]** y **A-Fos^W[Tb]** con **c-Jun**, se ajustaron a un modelo 1:1 para un ligando marcado de manera luminiscente (**C3[Tb]**, **C10a**, **C11a**, $^{17}\text{K}_4[\text{Tb}]$, **Fos^W[Tb]** y **A-Fos^W[Tb]**) unido a un receptor no marcado (ciclina A, **E₄** y **c-Jun**).

Si se ignora la unión no específica, la interacción entre ligando y receptor se describe por las ecuaciones 1-4:

$$(1) \quad K_D = \frac{R \times L}{RL}$$

$$(2) \quad R_T = R + RL$$

$$(3) \quad L_T = L + RL$$

$$(4) \quad F_T = F_0 + F_{RL} \times RL$$

Donde R es la concentración del receptor libre en el equilibrio; R_T es la concentración total de receptor; L es la concentración del ligando marcado libre en el equilibrio; L_T es la concentración total del ligando marcado; K_D es la constante de disociación de la interacción entre el receptor y el ligando; RL es la concentración del complejo ligando marcado-receptor; F_T es la emisión total observada; F_0 es un parámetro ajustable para contabilizar la emisión de fondo; F_{RL} es un parámetro ajustable para la emisión molar del complejo marcado ligando-receptor. Resolviendo las ecuaciones 1-4 para F_T y eliminando R, L y RL, se obtiene la ecuación ya conocida (5)^{105,124} que fue utilizada para el ajuste de los datos experimentales utilizando un análisis de regresión no lineal. La derivación de la ecuación y el ajuste de los datos fue hecho con el programa Mathematica® 8.0.0.0 para Mac OS X (Wolfram Research, Inc.).

$$(5) \quad F_T = \frac{1}{2} \left(2F_0 + F_{RL} \times \left[K_D + L_T + R_T - \sqrt{(K_D + L_T + R_T)^2 - 4L_T R_T} \right] \right)$$

124 a) Roehrl, M. H. A.; Wang, J. Y.; Wagner, G. *Biochemistry* **2004**, 43, 16056. b) Eftink, M. R. *Methods Enzymol.* **1997**, 278, 221. c) Shi, G.; Gong, Y.; Savchenko, A.; Zeikus, J. G.; Xiao, B.; Ji, X.; Yan, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1478, 289.

Para los ensayos de competición del complejo formado por **C11a** con ciclina A con los inhibidores **I1**, **I2** y **I3**, los datos experimentales se ajustaron a un modelo (6) para un ligando no marcado, L, y un ligando marcado de manera fluorescente, L_s, que compiten por la unión a un receptor no marcado R.^{124a}

$$(6) \quad F_T = F_0 + (F_{\max} - F_0) \frac{2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos(\theta/3) - a}{3K_{D1} + 2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos(\theta/3) - a}$$

donde:

$$\theta = \arccos \left[\frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}} \right]$$

$$a = K_{D1} + K_{D2} + L_{ST} + L_T - R_T$$

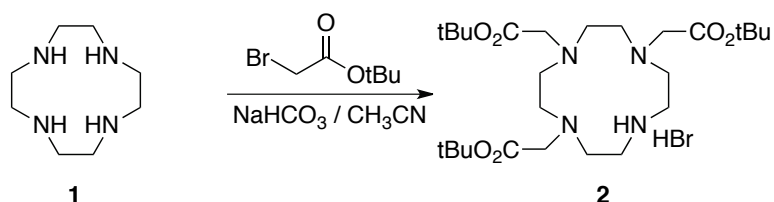
$$b = (L_T - R_T)K_{D1} + (L_{ST} - R_T)K_{D2} + K_{D1}K_{D2}$$

$$c = -K_{D1}K_{D2}R_T$$

Donde: R_T es la concentración total del receptor; L_{ST} es la concentración total de ligando marcado; L_T es la concentración total de ligando no marcado; K_{D1} es la constante de disociación de la interacción entre el receptor y el ligando marcado; K_{D2} es la constante de disociación de la interacción entre el receptor y el ligando no marcado; F_T es la fluorescencia total observada; F₀ es un parámetro ajustable para contabilizar la señal de fluorescencia de fondo; F_{max} es un parámetro ajustable para la señal de fluorescencia del complejo ligando marcado-receptor inicial.

Reacciones

Hidrobromuro de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (2)

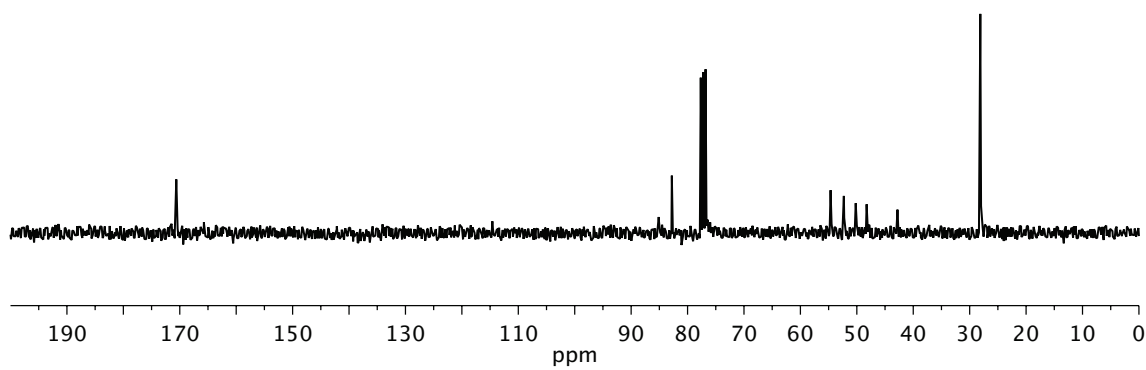
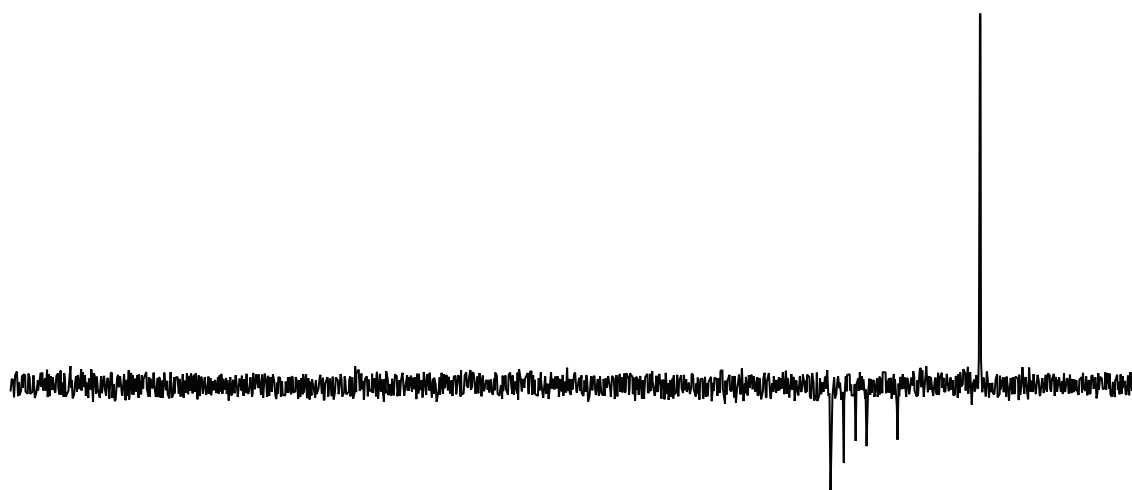
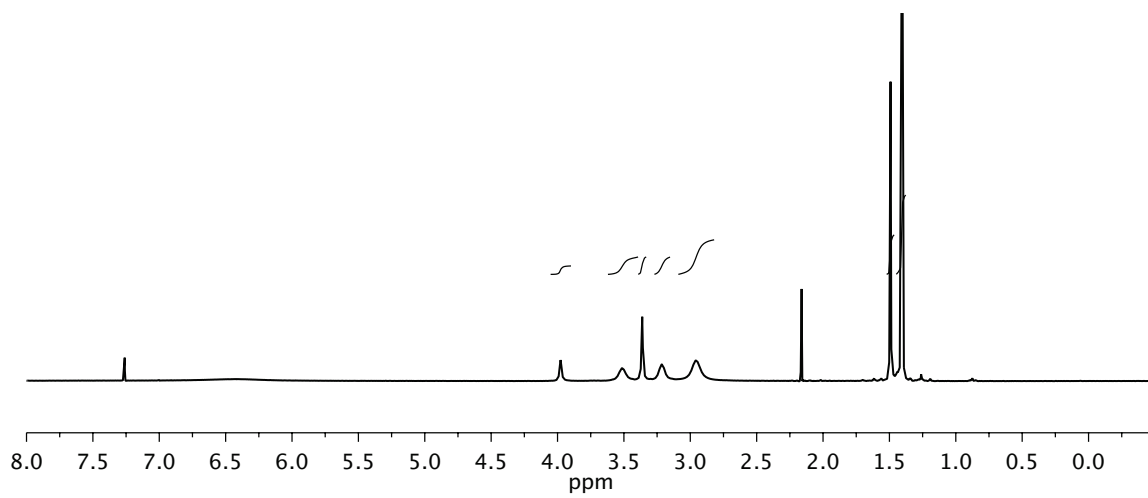


El 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (1.78 g, 10 mmol) y el bicarbonato sódico (2.78 g, 33 mmol) se agitaron bajo Ar en CH₃CN seco (60 mL) enfriado a 0 °C mientras se añadió bromoacetato de *tert*-butilo (6.45 g, 33 mmol) gota a gota en un embudo de presión compensada durante 45 min. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y bajo Ar durante 48 h. Los sólidos inorgánicos se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un sólido beige. Este se recristalizó en tolueno obteniéndose el producto como un sólido blanco (1.96 g, 33%).

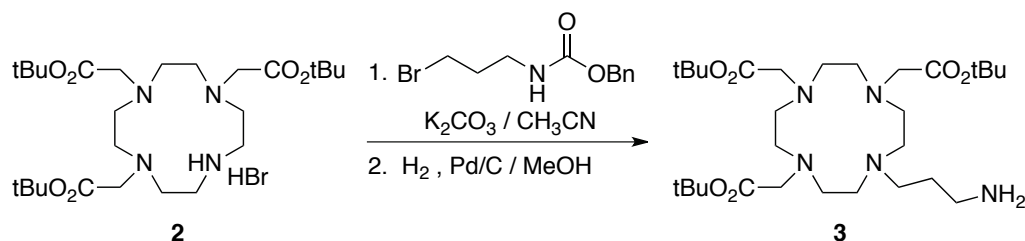
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.41 (s, 18H), 1.49 (s, 9H), 2.96 (s ancho, 8H), 3.22 (s ancho, 4H), 3.36 (s, 4H), 3.51 (s ancho, 4H), 3.98 (s, 2H).

¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 28.1 (CH₃), 42.8 (CH₂), 48.3 (CH₂), 50.2 (CH₂), 52.3 (CH₂), 54.7 (CH₂), 82.8 (C), 170.6 (CO).

HRMS-ESI (m/z): [MH]⁺ calcd para C₂₆H₅₁N₄O₆ 515.3730, encontrada 515.3773.



1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-10-(3'-aminopropil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (3)

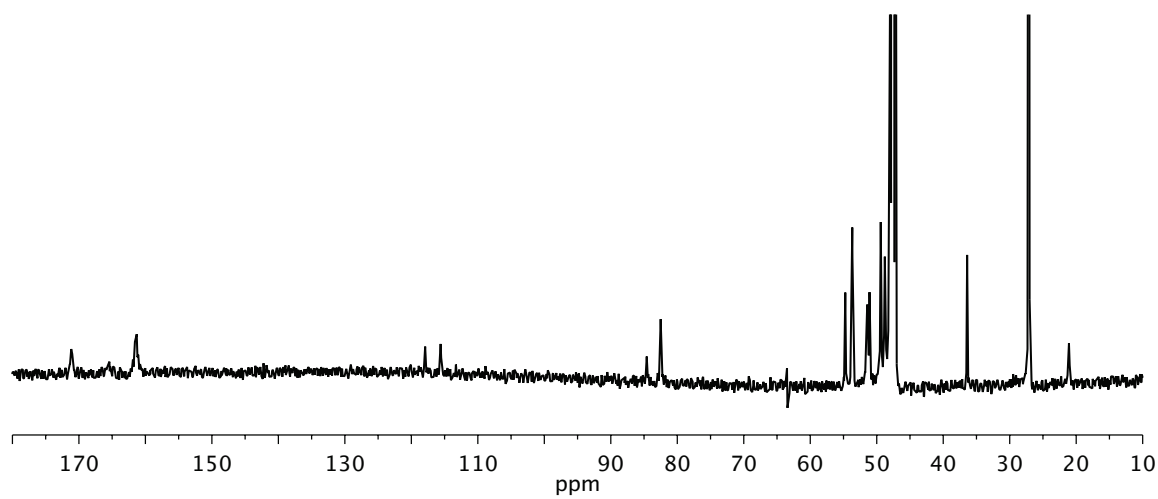
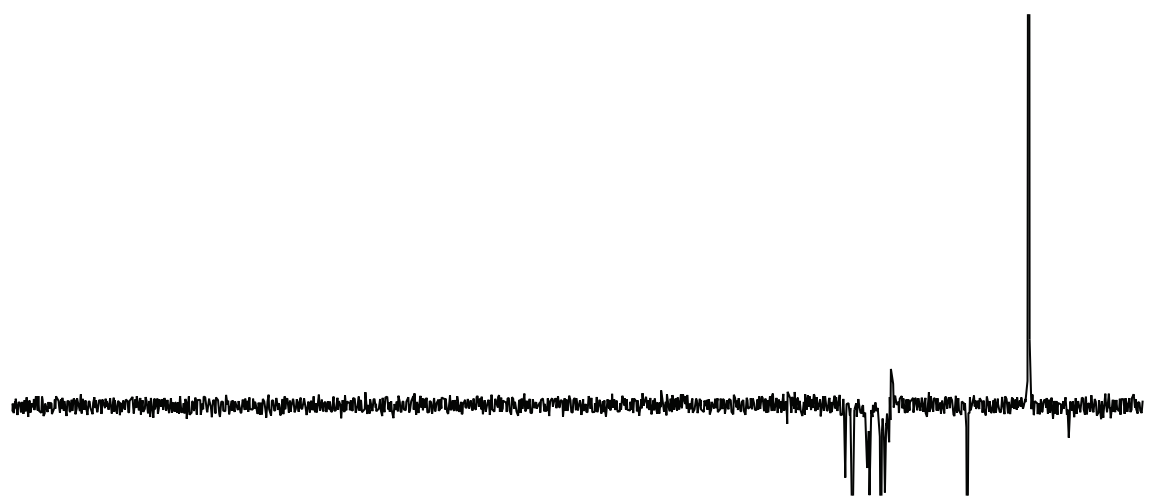
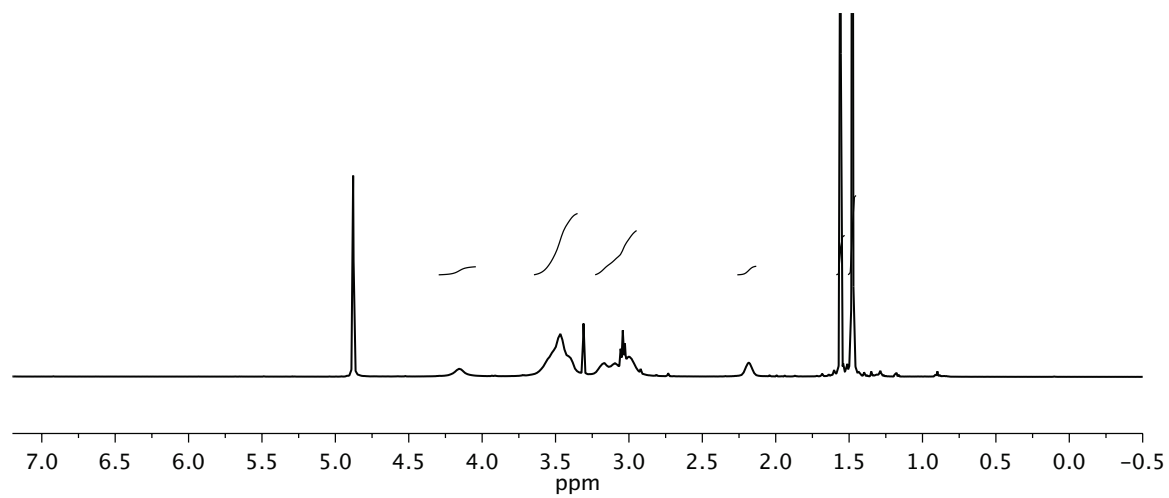


El hidrobromuro de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (150 mg, 0.25 mmol) se disolvió en CH₃CN seco (10 mL). Se añadió carbonato potásico (104 mg, 0.75 mmol) y 3-bromopropilcarbamatato de bencilo (137 mg, 0.50 mmol). La mezcla de reacción se dejó a reflujo y bajo Ar durante 16 h. Los sólidos inorgánicos se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido que se purificó en columna (4% MeOH/CH₂Cl₂). Este se disolvió en MeOH (10 mL), se añadió el Pd/C (27 mg, 10%) y la reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 16 h. La mezcla resultante se filtró a través de celita, se concentró bajo presión reducida y se purificó en un sistema de cromatografía preparativa en fase reversa (25→95% MeOH, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min) para dar un sólido amarillo pálido (64 mg, 44%).

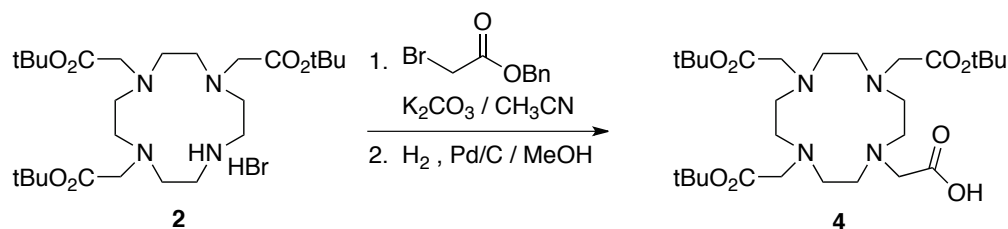
¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 1.48 (s, 18H), 1.56 (s, 9H), 2.18 (s ancho, 2H), 2.95-3.23 (m, 10H), 3.35-3.65 (m, 14H), 4,16 (s ancho, 2H).

¹³C-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 21.1 (CH₂), 27.1 (CH₃), 36.4 (CH₂), 48.8 (CH₂), 49.4 (CH₂), 51.1 (CH₂), 51.4 (CH₂), 53.7 (CH₂), 54.7 (CH₂), 82.5 (C), 84.6 (C), 161.3 (CO), 171.2 (CO).

HRMS-ESI (m/z): [MH]⁺ calcd para C₂₉H₅₈N₅O₆ 572.4309, encontrada 572.4355.



Ácido 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-10-acético (4)

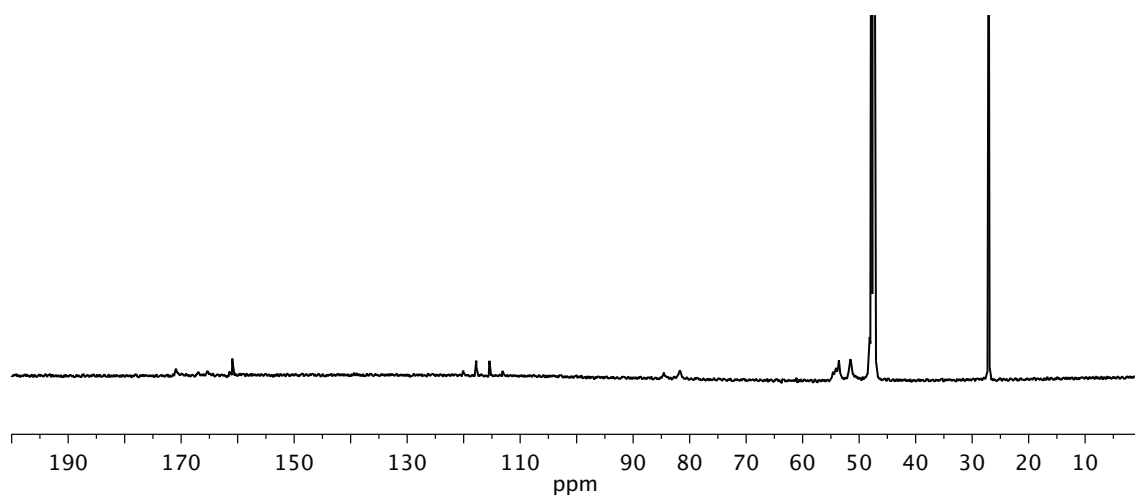
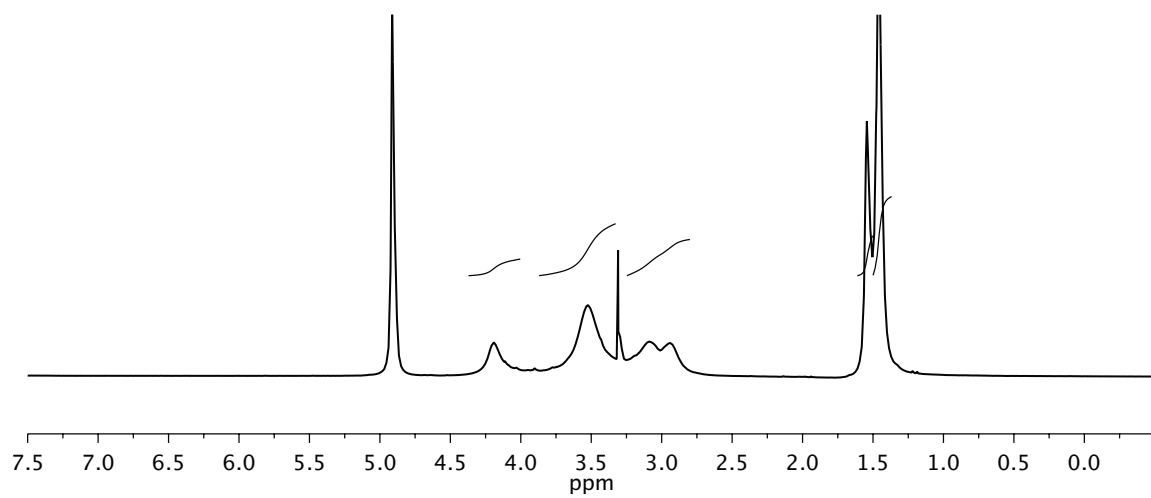


El hidrobromuro de 1,4,7-tris(*tert*-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (1.46 g, 2.83 mmol) se disolvió en CH₃CN seco (200 mL). A continuación se añadió carbonato potásico (1.17 g, 8.49 mmol) y bromoacetato de bencilo (1.29 g, 5.66 mmol). La mezcla de reacción se dejó a reflujo y bajo Ar durante 24 h. Los sólidos inorgánicos se filtraron y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un aceite amarillo pálido que se purificó en columna (5% MeOH/CH₂Cl₂). Este se disolvió en MeOH (60 mL), se añadió el Pd/C (80 mg, 10%) y la reacción se agitó a temperatura ambiente bajo hidrógeno durante 16 h. La mezcla resultante se filtró a través de celita, se concentró bajo presión reducida y se purificó en un sistema de cromatografía preparativa en fase reversa (15→75% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min) para dar un sólido blanco (760 mg, 47%).

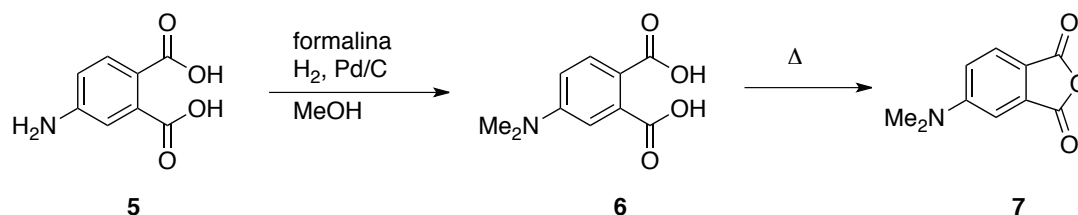
¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 1.47 (s, 18H), 1.54 (s, 9H), 2.80-3.01 (m, 8H), 3.52 (s ancho, 12H), 4.19 (s ancho, 4H).

¹³C-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 27.1 (CH₃), 51.7 (CH₂), 53.6 (CH₂), 54.7 (CH₂), 81.7 (C), 84.6 (C), 160.9 (CO), 161.2 (CO), 170.9 (CO).

HRMS-ESI (m/z): [MH]⁺ calcd para C₂₈H₅₃N₄O₈ 573.3785, encontrada 573.3842.



Anhídrido 4-dimetilaminoftálico (7)

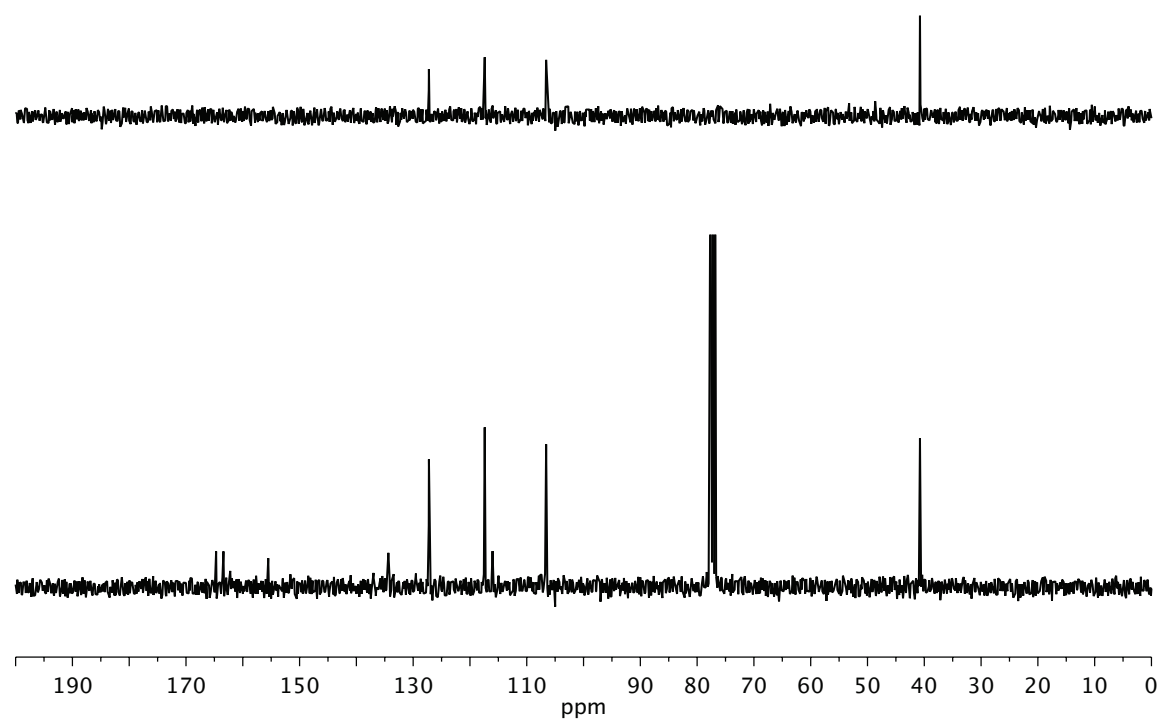
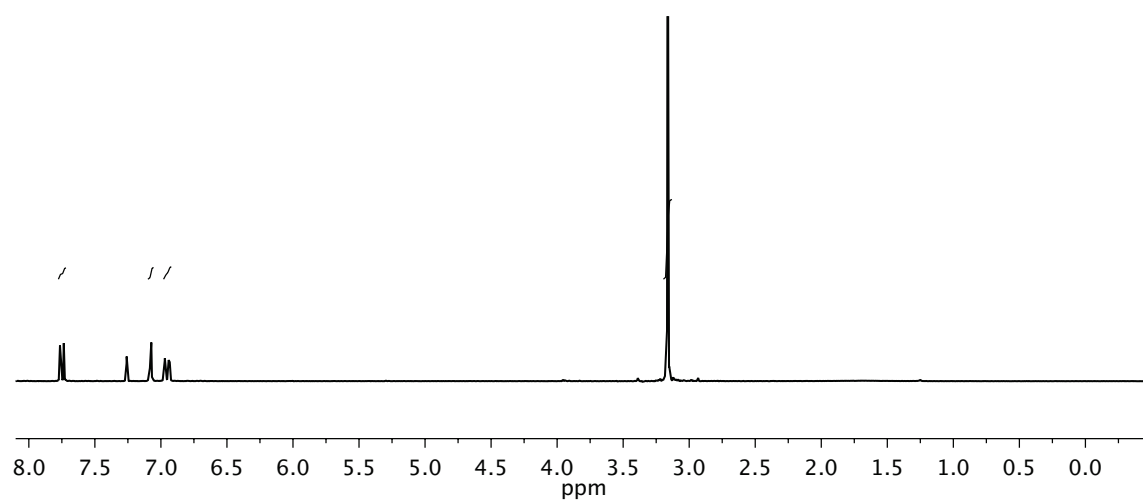


El ácido 4-aminoftálico (500 mg, 2.76 mmol) se disolvió en MeOH (150 mL). A continuación se añadió formalina (15 mL, disolución de formaldehído al 36%) y Pd/C 10% (200 mg) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de hidrógeno durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró sobre celita y el filtrado se concentró a presión reducida para dar el ácido 4-dimetilaminoftálico como un sólido blanco. Este se introdujo en un sublimador y se calentó a 140 °C durante 10 h a presión reducida de bomba de vacío para dar el producto deseado como un sólido amarillo intenso (429 mg, 81%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.16 (s, 6H), 6.95 (dd, 1H, J₁ = 2.4 Hz, J₂ = 8.7 Hz), 7.08 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 7.75 (d, 1H, J = 8.6 Hz).

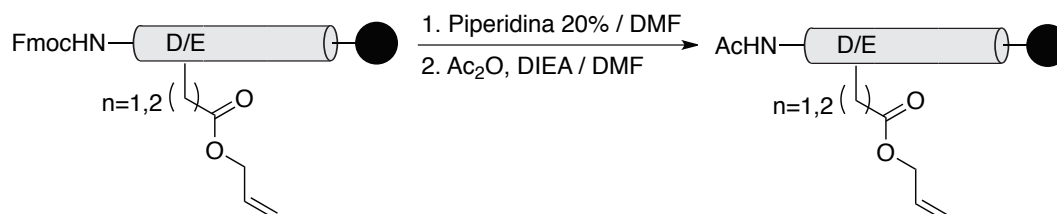
¹³C-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 40.8 (CH₃), 106.6 (CH), 116.0 (C), 117.4 (CH), 127.2 (CH), 134.4 (C), 155.5 (C), 163.4 (CO), 164.7 (CO).

HRMS-ESI (m/z): [MH]⁺ calcd para C₁₀H₁₀NO₃ 192.0655, encontrada 192.0658.



Síntesis de los péptidos K1D, ^PK1D, K1E y ^PK1E

Síntesis en fase sólida y acetilación

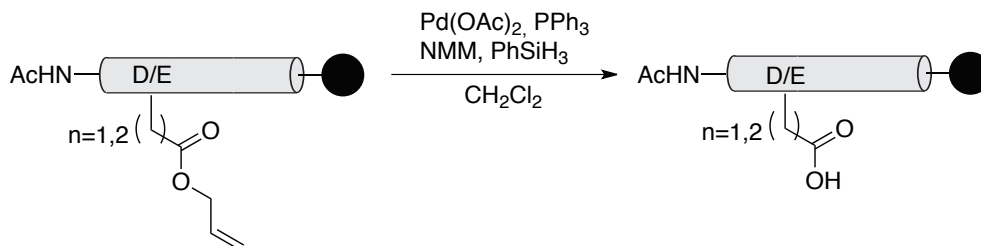


Las secuencias peptídicas de **K1D**, ^P**K1D**, **K1E** y ^P**K1E** se sintetizaron manualmente en fase sólida en una escala de 0.05 mmol usando la resina PAL-PEG-PS y siguiendo el protocolo general de síntesis de péptidos en fase sólida ya descrito.

0.05 mmol de los péptidos unidos a la resina PAL-PEG-PS se trataron con 20% piperidina en DMF (5 mL) durante 20 min y a continuación se lavó la resina con DMF (4 × 5 mL × 2 min).

Una vez desprotegido el extremo N-terminal, este se acetiló por tratamiento con una disolución de Ac₂O al 20% en DMF (2.5 mL) y DIEA 0.195 M en DMF (1.75 mL) durante 45 min. A continuación se lavó la resina con DMF (2 × 5 mL × 3 min) y se llevó a cabo el test de TNBS para comprobar que el extremo N-terminal se había acetilado. Finalmente la resina se lavó con CH₂Cl₂ (2 × 5 mL × 3 min) y se secó bajo corriente de Ar.

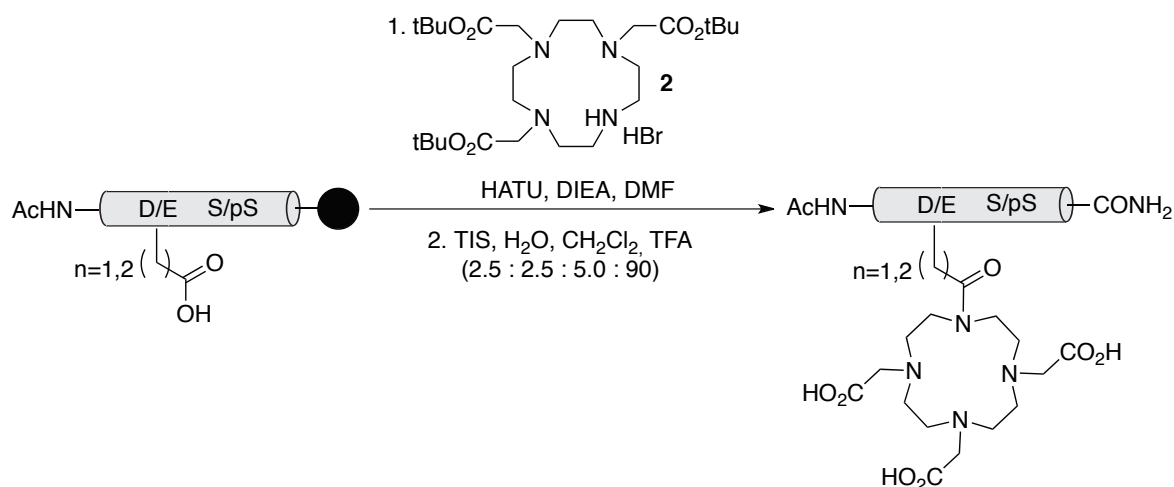
Eliminación del grupo alilo



0.05 mmol de los péptidos unidos a la resina PAL-PEG-PS se trataron durante 11 h con una mezcla de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (3.4 mg, 0.015 mmol), PPh_3 (19.7 mg, 0.075 mmol), NMM (55 μL , 0.5 mmol) y PhSiH_3 (62 μL , 0.5 mmol). A continuación, se filtró y lavó la resina con THF (1 \times 5 mL \times 2 min), DMF (2 \times 5 mL \times 2 min), DEDTC (25 mg en 5 mL de DMF, 1 \times 5 min), DMF (2 \times 5 mL \times 2 min) y CH_2Cl_2 (2 \times 5 mL \times 2 min) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μL de la mezcla de desprotección, TIS (25 μL), H_2O (25 μL), CH_2Cl_2 (50 μL) y TFA (900 μL), durante 3 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente lineal 15 \rightarrow 95% CH_3CN , 0.1% TFA / H_2O , 0.1% TFA en 30 min.

Acoplamiento del ligando 2



Para el acoplamiento del ligando **2** sobre el grupo ácido ortogonalmente desprotegido se partió de los péptidos unidos a la resina PAL-PEG-PS (≈ 0.02 mmol), se añadió DMF anhidra (1 mL), HATU (7.6 mg, 0.02 mmol) y DIEA 0.195M en DMF (154 μL , 0.03 mmol) y la mezcla se agitó durante 5 min para activar el ácido. A continuación se añadió el ligando **2** (47.8 mg, 0.08 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 4 h. La resina se lavó con DMF (2×1.5 mL $\times 2$ min) y CH_2Cl_2 (2×1.5 mL $\times 2$ min) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μL de la mezcla de desprotección, TIS (25 μL), H_2O (25 μL), CH_2Cl_2 (50 μL) y TFA (900 μL), durante 3.5 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente lineal 15 \rightarrow 95% CH_3CN , 0.1% TFA / H_2O , 0.1% TFA en 30 min.

Una vez comprobado que el ligando está acoplado al péptido, se procedió a la desprotección y ruptura de la resina del péptido por tratamiento con 3 mL de la mezcla de desprotección durante 3.5 h. El péptido se precipitó sobre Et_2O y se separó por centrifugación. El péptido obtenido como un precipitado se purificó por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizó.

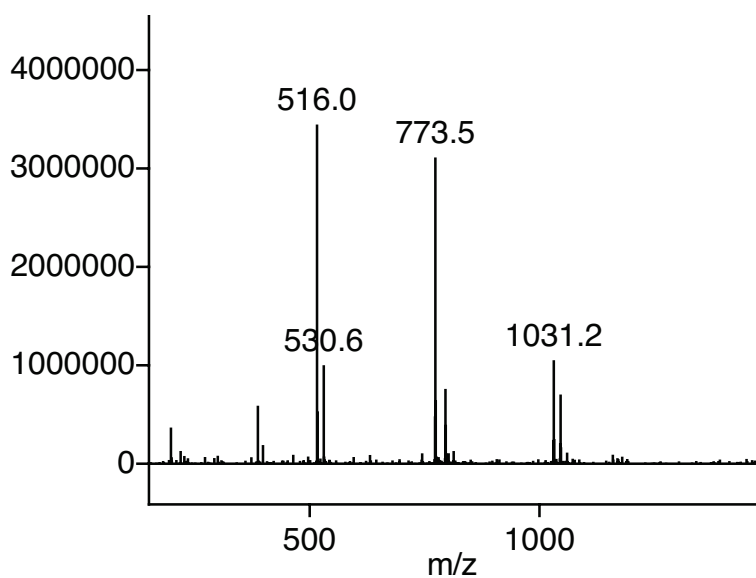
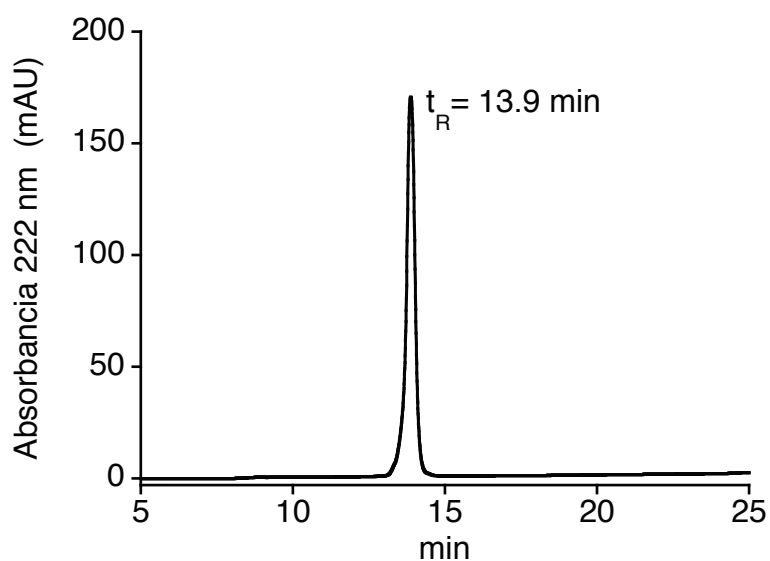
Los péptidos **K1D**, ^P**K1D**, **K1E** y ^P**K1E** se aislaron como sólidos de color blanco.

K1D: (7.1 mg, 23%).

$t_R = 13.9$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₈H₁₀₅N₂₄O₁₈ = 1545.8, encontrada = 773.5 [MH₂]²⁺; 516.0 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

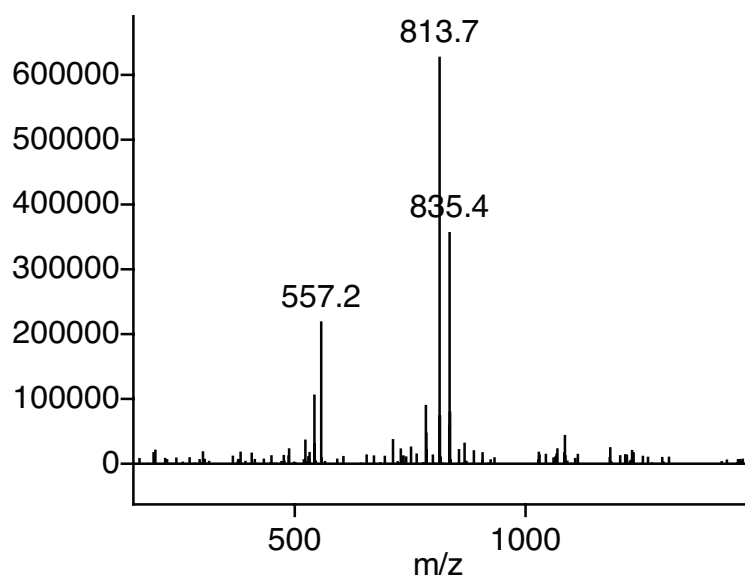
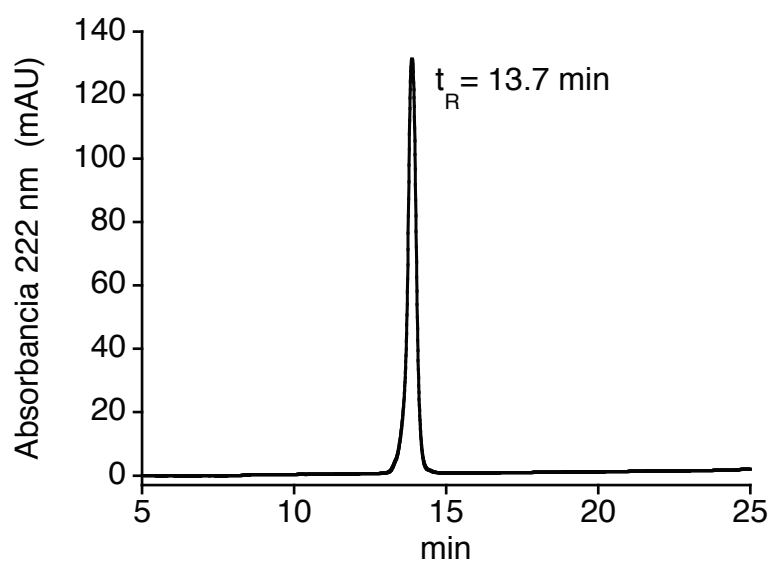


^PK1D: (8.8 mg, 27%).

$t_R = 13.7$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₈H₁₀₆N₂₄O₂₁P = 1625.8, encontrada = 835.4 [MNa₂]²⁺; 813.7 [MH₂]²⁺; 557.2 [MHN₂]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

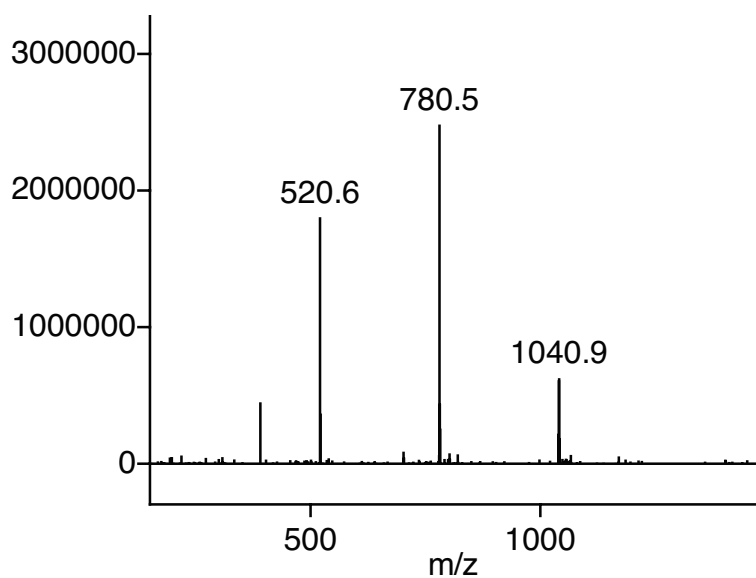
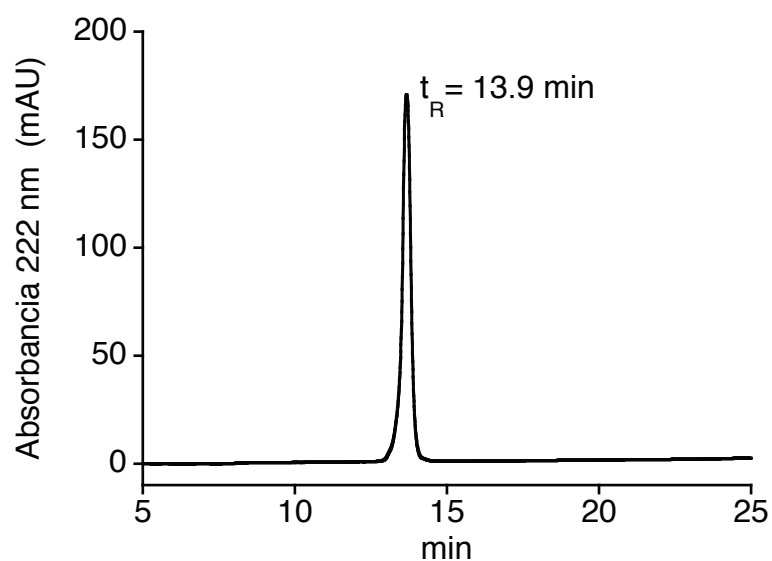


K1E: (6.5 mg, 21%).

$t_R = 13.9$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₉H₁₀₇N₂₄O₁₈ = 1559.8, encontrada = 780.5 [MH₂]²⁺; 520.6 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

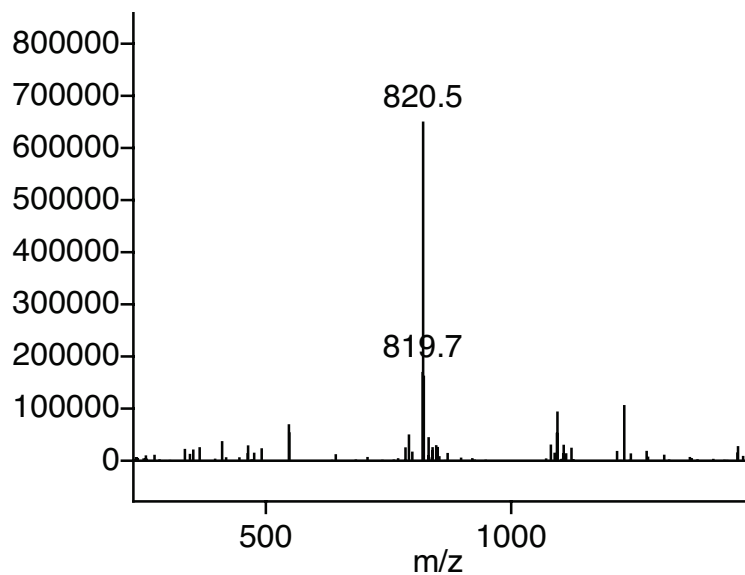
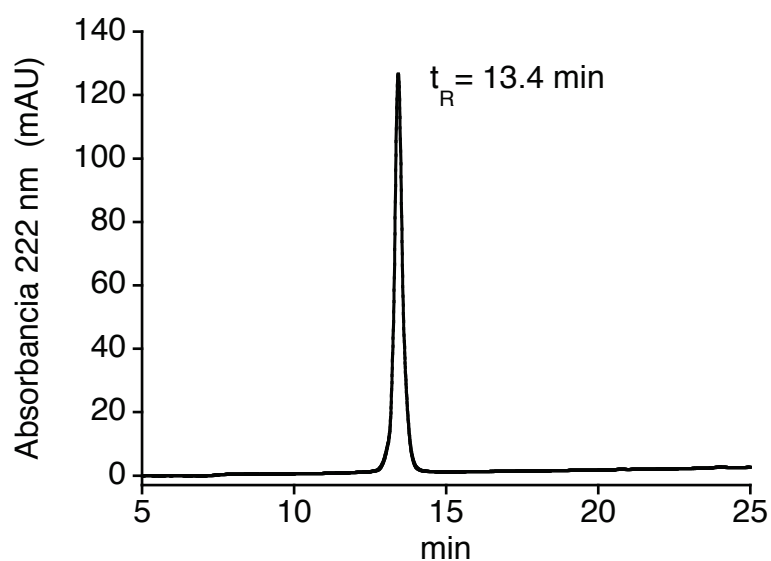


^PK1E: (5.9 mg, 18%).

$t_R = 13.4$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

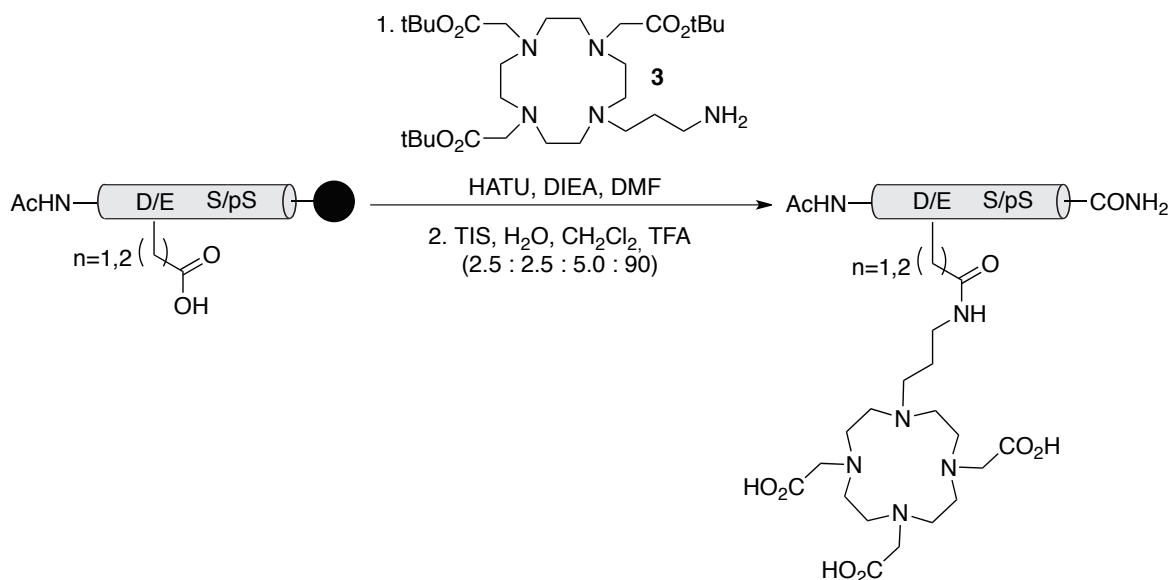
ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₉H₁₀₈N₂₄O₂₁P = 1639.8, encontrada = 820.5 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.



Síntesis de los péptidos K2D, ^PK2D, K2E y ^PK2E

Acoplamiento del ligando 3



Para el acoplamiento del ligando **3** sobre el grupo ácido ortogonalmente desprotegido se partió de las secuencias peptídicas de los péptidos **K1**, con la cadena lateral en la que se va a realizar el acoplamiento ya desprotegida, unidas a la resina PAL-PEG-PS (≈ 0.01 mmol) y se añadió DMF anhidra (0.5 mL), HATU (3.8 mg, 0.01 mmol) y DIEA 0.195M en DMF (77 μL , 0.015 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 5 min para activar el ácido. A continuación se añadió el ligando **3** (17 mg, 0.03 mmol) y se mantuvo la agitación durante 4 h. La resina se lavó con DMF (2×1 mL $\times 2$ min) y CH_2Cl_2 (2×1 mL $\times 2$ min) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μL de la mezcla de desprotección, TIS (25 μL), H_2O (25 μL), CH_2Cl_2 (50 μL) y TFA (900 μL), durante 3.5 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente lineal 15 \rightarrow 95% CH_3CN , 0.1% TFA / H_2O , 0.1% TFA en 30 min.

Una vez comprobado que el ligando está acoplado al péptido, se procedió a la desprotección y ruptura de la resina del péptido por tratamiento con 1.5 mL de la mezcla de desprotección durante 3.5 h. El péptido se precipitó sobre Et_2O , se separó por centrifugación, se purificó por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizó.

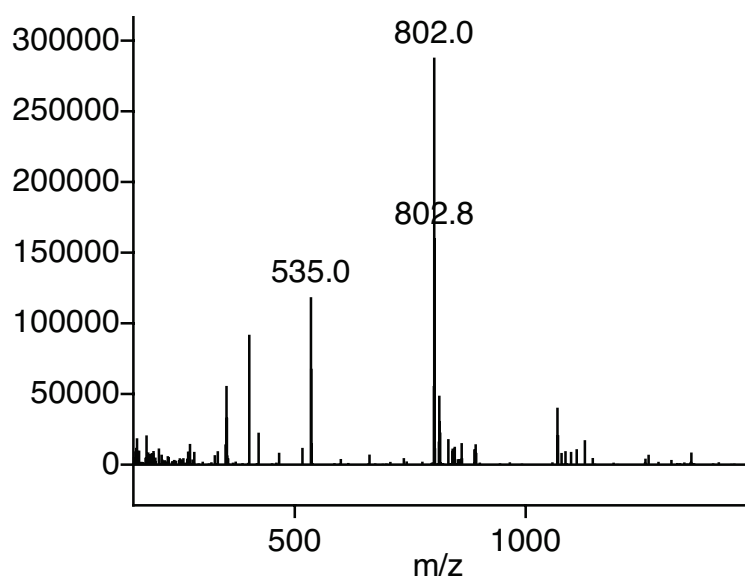
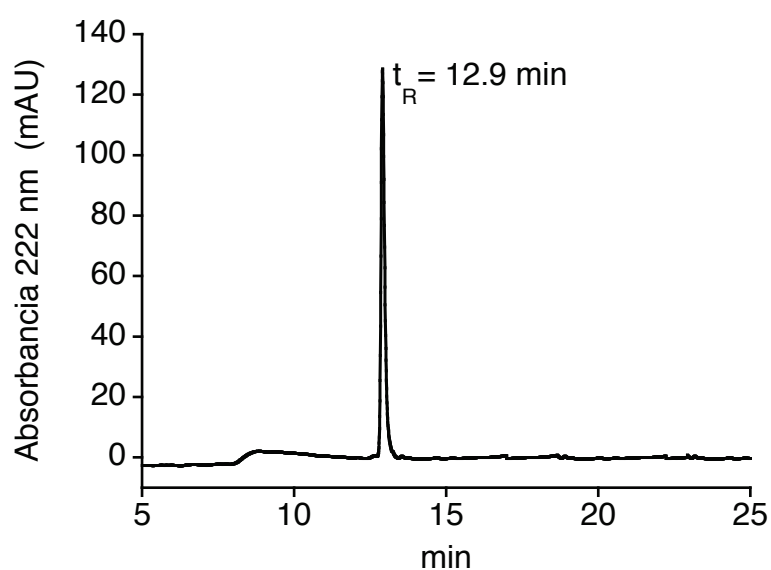
Los péptidos **K2D**, ^P**K2D**, **K2E** y ^P**K2E** se aislaron como sólidos de color blanco.

K2D: (2.9 mg, 18%).

$t_R = 12.9$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₇₁H₁₁₂N₂₅O₁₈ = 1602.9, encontrada = 802.0 [MH₂]²⁺; 535.0 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

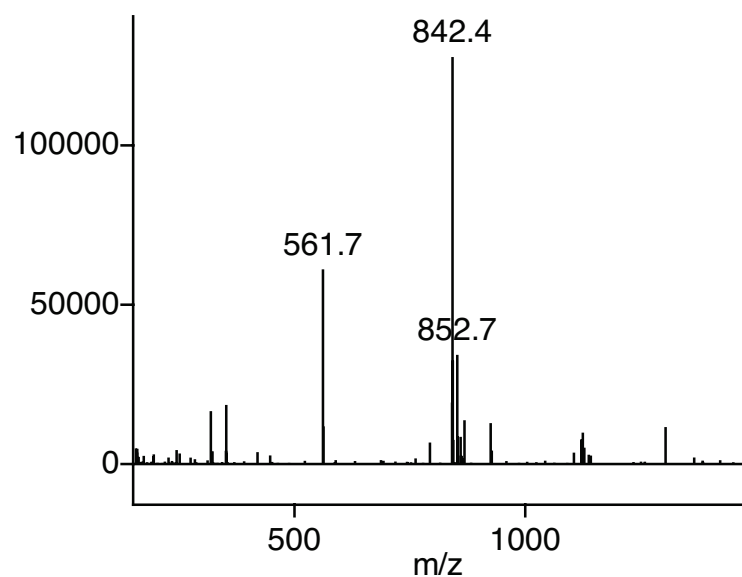
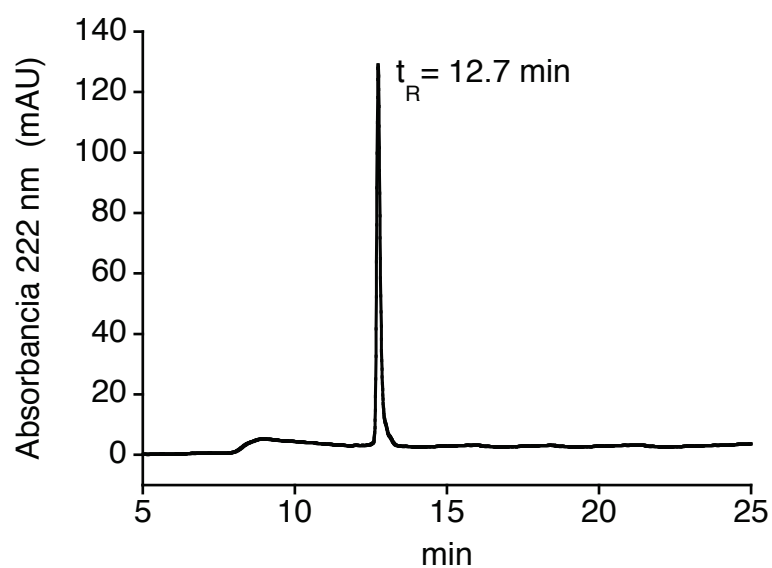


^pK2D: (3.5 mg, 21%).

$t_R = 12.7$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₇₁H₁₁₃N₂₅O₂₁P = 1682.8, encontrada = 842.4 [MH₂]²⁺; 561.7 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

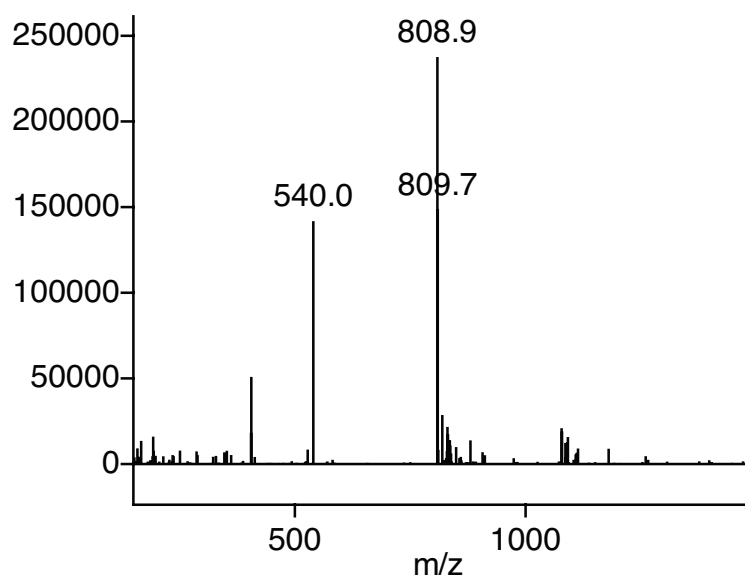
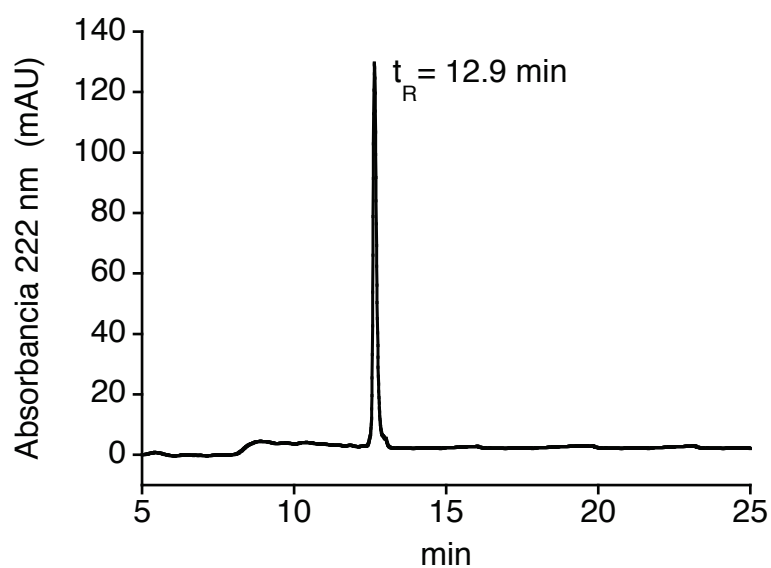


K2E: (4.3 mg, 27%).

$t_R = 12.9$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₇₂H₁₁₄N₂₅O₁₈ = 1616.9, encontrada = 808.9 [MH₂]²⁺; 540.0 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

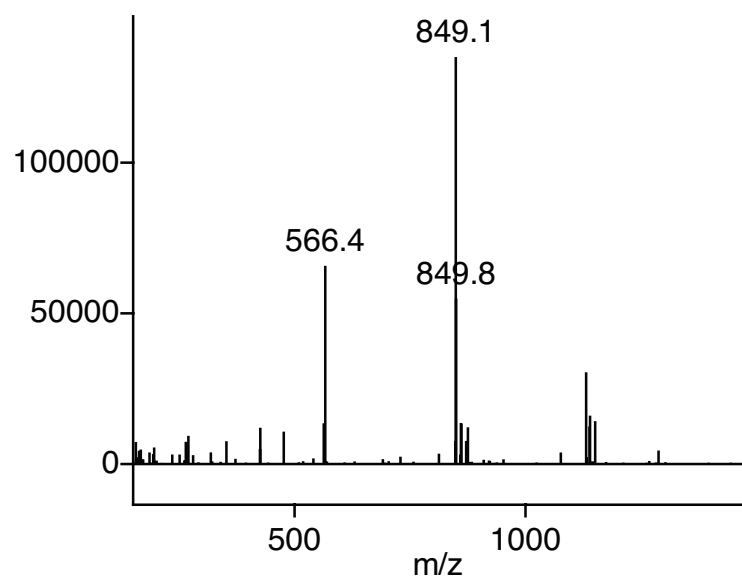
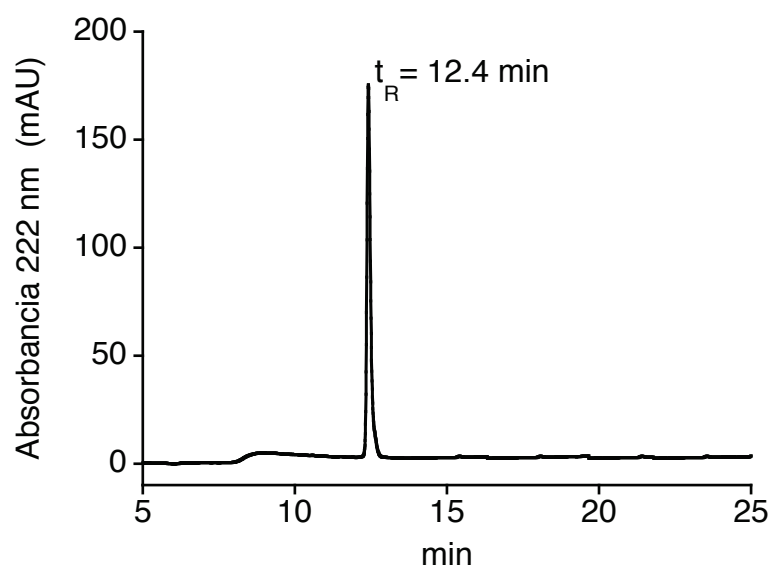


^pK₂E: (4.1 mg, 24%).

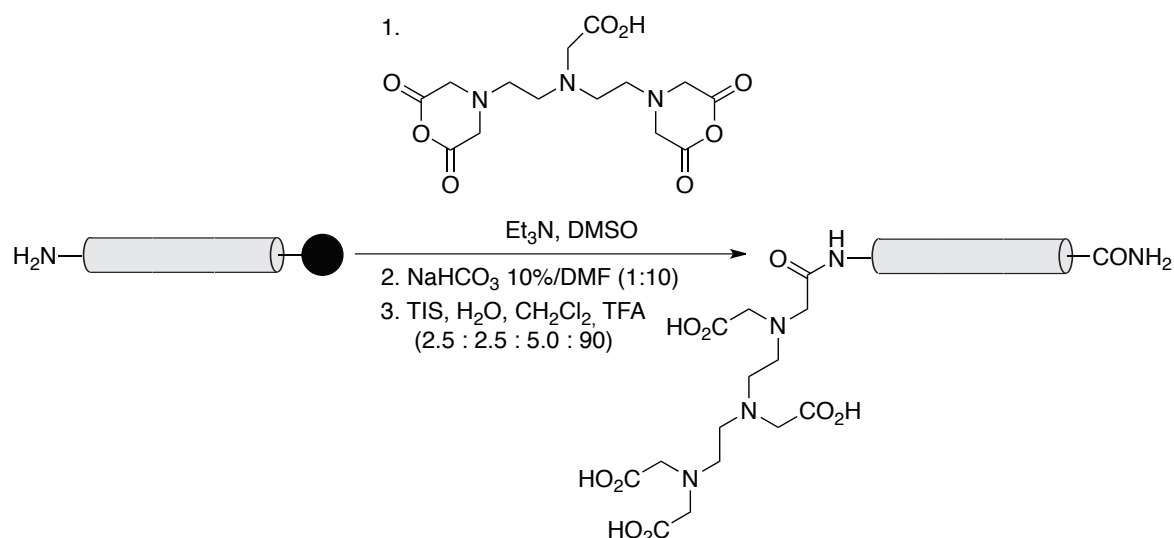
$t_R = 12.4$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₇₂H₁₁₅N₂₅O₂₁P = 1696.8, encontrada = 849.1 [MH₂]²⁺; 566.4 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.



Síntesis de los péptidos C1 y C2



Las secuencias peptídicas se sintetizaron manualmente en fase sólida en una escala de 0.05 mmol unidas a la resina PAL-PEG-PS, siguiendo para ello el protocolo general de síntesis de péptidos en fase sólida ya descrito. Una vez desprotegido el extremo N-terminal por tratamiento con 20% piperidina en DMF (5 mL) durante 20 min y lavada la resina con DMF (4 × 5 mL × 2 min) se procedió al acoplamiento del DTPA al extremo N-terminal.

Sobre una suspensión de los péptidos (≈ 0.033 mmol) en fase sólida en 2.5 mL de DMSO anhidro y Et₃N (23 μ L, 0.165 mmol), se añadió el dianhídrido de DTPA (59 mg, 0.165 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 14 h. Se filtró la resina y se lavó con DMF (2 × 2.5 mL × 5 min), se resuspendió en DMF (2 mL) y se trató con NaHCO₃ (200 μ L, 10% en H₂O) durante 1.5 h. Se filtró de nuevo la resina y se lavó con DMF (2 × 2.5 mL × 5 min) y CH₂Cl₂ (2 × 2.5 mL × 5 min) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μ L de la mezcla de desprotección, TIS (25 μ L), H₂O (25 μ L), CH₂Cl₂ (50 μ L) y TFA (900 μ L), durante 2 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min.

Una vez comprobado que el ligando está acoplado al péptido, se procedió a la desprotección y ruptura de la resina del péptido por tratamiento con 3 mL de la mezcla de desprotección durante 2 h. El péptido se precipitó sobre Et₂O y se separó por centrifugación. El péptido obtenido como un precipitado se purificó

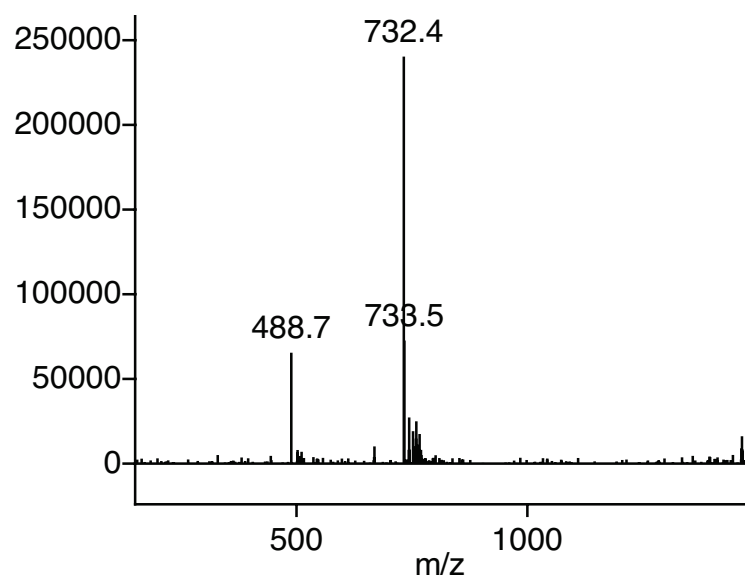
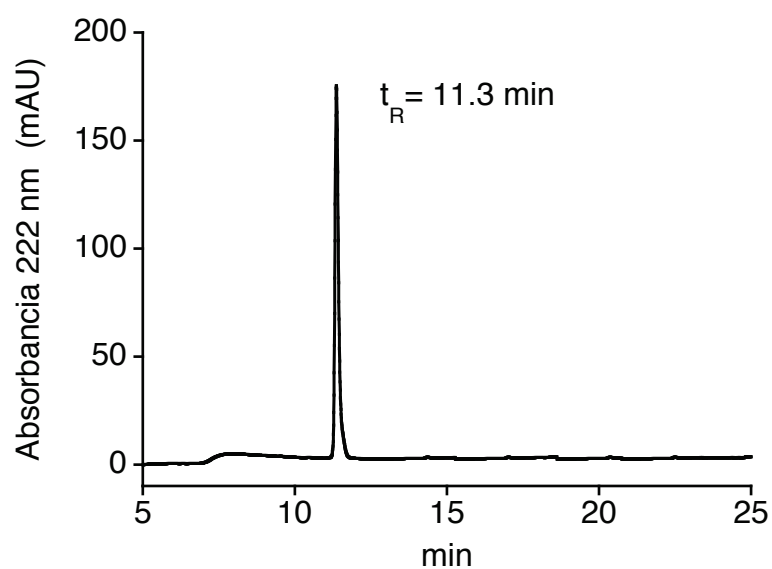
por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizó. En ambos casos los péptidos se aislaron como sólidos de color blanco.

C1: (2.9 mg, 6%).

$t_R = 11.3$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₃H₁₀₇N₂₀O₂₀ = 1463.8, encontrada = 732.4 [MH₂]²⁺; 488.7 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

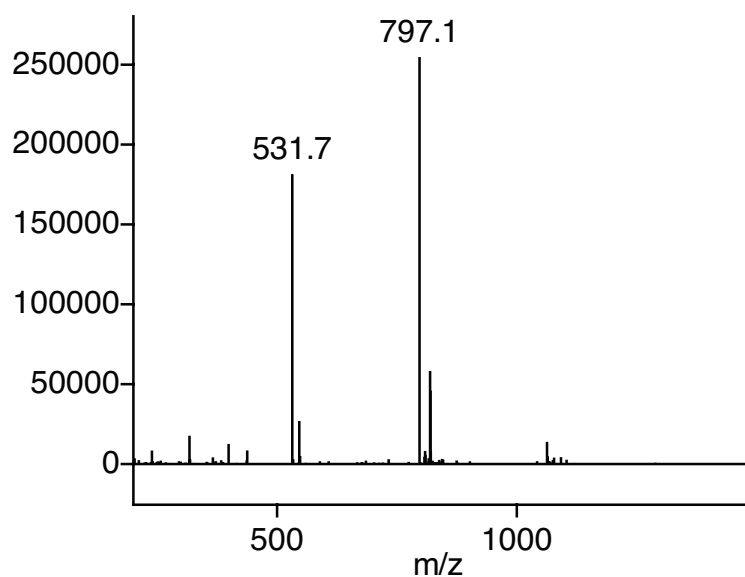
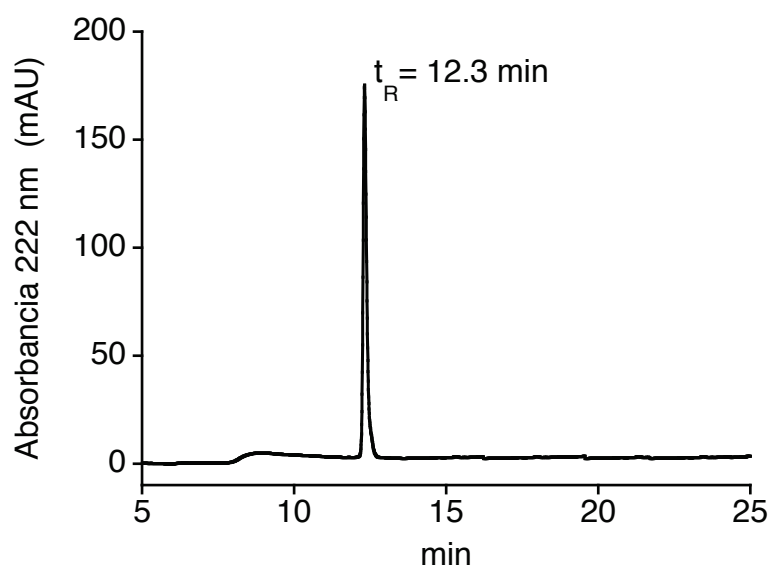


C2: (4.7 mg, 9%).

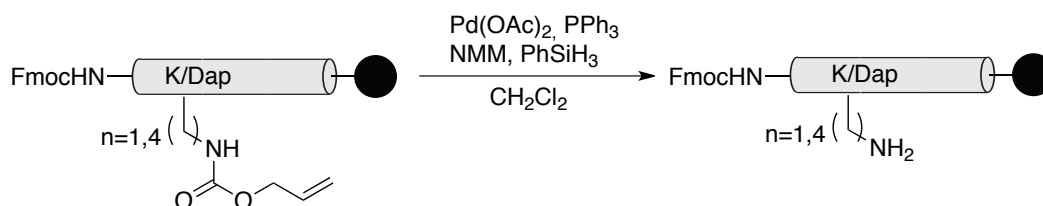
$t_R = 12.3$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₇₂H₁₁₄N₂₁O₂₀ = 1592.8, encontrada = 797.1 [MH₂]²⁺; 531.7 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.



Protocolo de eliminación ortogonal del grupo alloc



Las secuencias peptídicas de **C3[Tb]**, **C4[Tb]**, **C5[Tb]**, **C6**, **C7a/b**, **C8a/b**, **C9a/b**, **C10a/b**, **C11a**, **C12a** y **C13a** se sintetizaron manualmente en fase sólida y las de ^{w9}**K₄[Tb]**, ^{w17}**K₄[Tb]**, ^{w9/17}**K₄[Tb]**, **Fos^w[Tb]** y **A-Fos^w[Tb]** se sintetizaron automáticamente en un sintetizador de péptidos en una escala de 0.05 mmol unidos a la resina PAL-PEG-PS, siguiendo para ello el protocolo general de síntesis de péptidos en fase sólida ya descrito.

0.05 mmol de los péptidos unidos a la resina PAL-PEG-PS se trataron durante 12 h con una mezcla de Pd(OAc)₂ (3.4 mg, 0.015 mmol), PPh₃ (19.7 mg, 0.075 mmol), NMM (55 μL, 0.5 mmol) y PhSiH₃ (62 μL, 0.5 mmol). A continuación, se filtró y lavó la resina con THF (1 × 5 mL × 2 min), DMF (2 × 5 mL × 2 min), DEDTC (25 mg en 5 mL de DMF, 1 × 5 min), DMF (2 × 5 mL × 2 min) y CH₂Cl₂ (2 × 5 mL × 2 min) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μL de la mezcla de desprotección, TIS (25 μL), H₂O (25 μL), CH₂Cl₂ (50 μL) y TFA (900 μL), durante 2 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min.

Para la obtención del péptido **C6**, una vez comprobado que el grupo alloc se ha eliminado correctamente, se desprotegió el extremo N-terminal (≈ 0.015 mmol) por tratamiento con 20% piperidina en DMF (5 mL) durante 20 min y se lavó la resina con DMF (4 × 5 mL × 2 min).

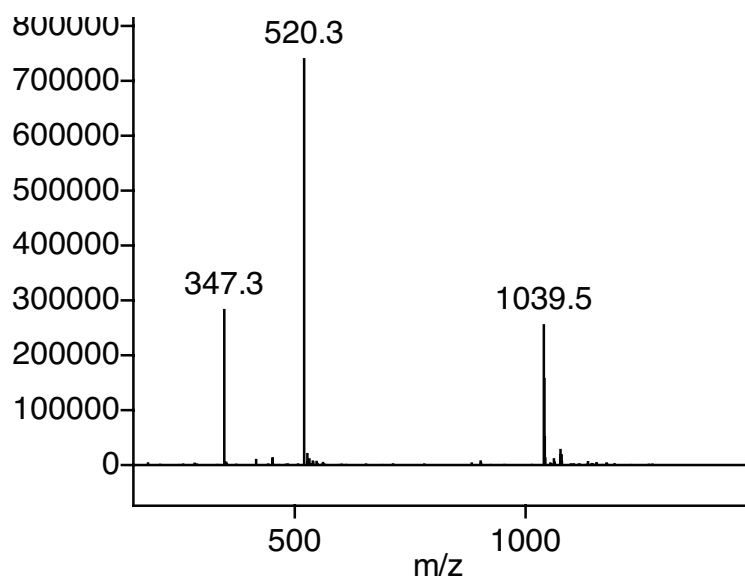
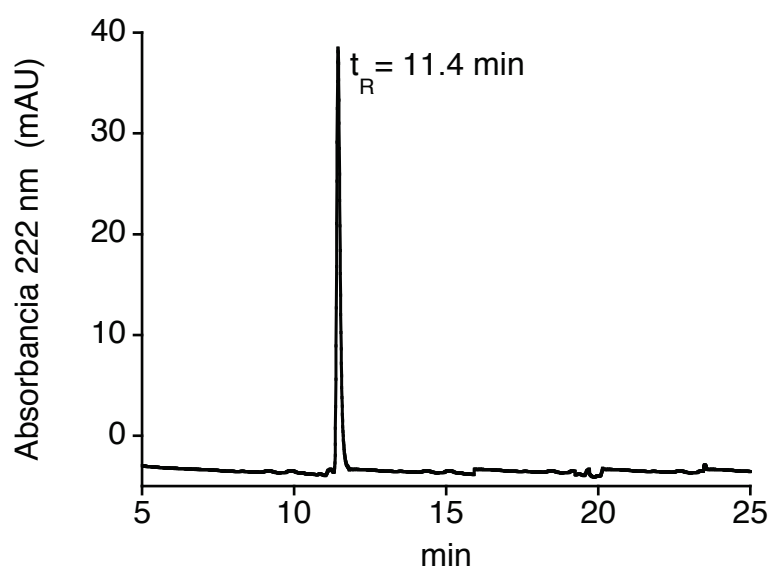
A continuación se procedió a la desprotección y ruptura del péptido de la resina por tratamiento con 2.5 mL de la mezcla de desprotección durante 2 h. El péptido se precipitó sobre Et₂O y se separó por centrifugación. El péptido obtenido como un precipitado se purificó por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizó. El péptido **C6** se aisló como un sólido de color blanco.

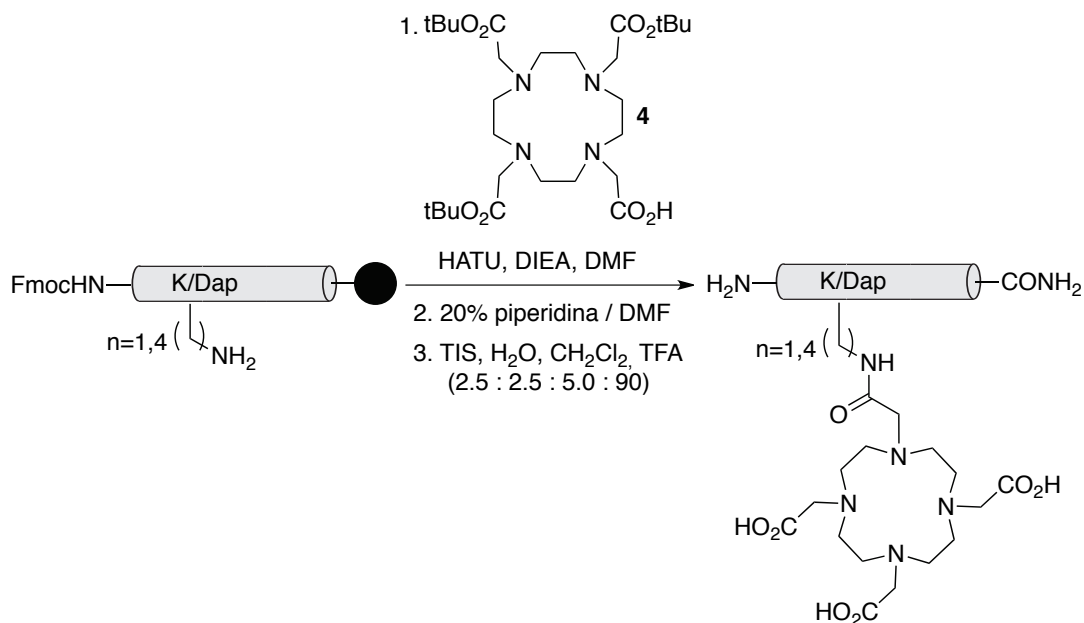
C6: (4.5 mg, 29%).

$t_R = 11.4$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₈H₈₃N₁₈O₈ = 1039.7, encontrada = 1039.5 [MH]⁺; 520.3 [MH₂]²⁺; 347.3 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.



Obtención de **C3**, **C4**, **C5**, ^{W9}**K**₄, ^{W17}**K**₄, ^{W9/17}**K**₄, **Fos**^W, **A-Fos**^W

Para la obtención de **C3**, se realizó el acoplamiento del ligando **4** sobre el extremo amino-terminal del péptido unido a la resina después de su desprotección por tratamiento con 20% piperidina en DMF (1.5 mL) durante 20 min y lavada la resina con DMF ($4 \times 1.5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$). Para el resto de los péptidos, el acoplamiento del ligando **4** se realizó sobre el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de Dap, excepto para la obtención del péptido **C4**, que se hizo en la cadena lateral de un residuo de Lys.

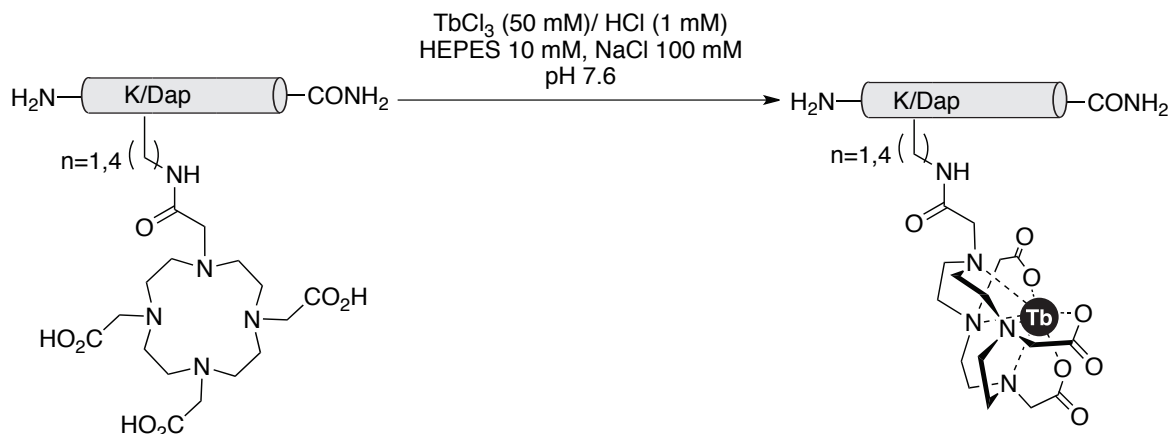
Para ello, se disolvieron el ligando **4** (35 mg, 0.06 mmol), HATU (23 mg, 0.06 mmol) y DIEA (15,6 μL , 0.09 mmol) en DMF anhidra (850 μL), después de activar el ácido durante 5 min la mezcla se añadió sobre la resina ($\approx 0.015 \text{ mmol}$) y se agitó durante 4 h. La resina se filtró y lavó con DMF ($2 \times 1 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$) y CH_2Cl_2 ($2 \times 1 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μL de la mezcla de desprotección, TIS (25 μL), H_2O (25 μL), CH_2Cl_2 (50 μL) y TFA (900 μL), durante 3.5 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente lineal 15 \rightarrow 95% CH_3CN , 0.1% TFA / H_2O , 0.1% TFA en 30 min.

Una vez comprobado que el ligando está acoplado al péptido, se desprotegió el extremo N-terminal de los péptidos en fase sólida por tratamiento con 20% piperidina en DMF (1.5 mL) durante 20 min y se lavó la resina con DMF ($4 \times$

1.5 mL \times 2 min). A continuación se procedió a la desprotección y ruptura del péptido de la resina por tratamiento con 4 mL de la mezcla de desprotección durante 3.5 h. El péptido se precipitó sobre Et₂O y se separó por centrifugación. Finalmente, el péptido precipitado se purificó por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizó, obteniéndose así los péptidos **C3**, **C4**, **C5**, ^{w9}**K₄**, ^{w17}**K₄**, ^{w9/17}**K₄**, **Fos^w** y **A-Fos^w** como sólidos blancos.

Coordinación de Tb^{3+} a los péptidos **C3**, **C4**, **C5**, $^{W9}K_4$, $^{W17}K_4$, $^{W9/17}K_4$, **Fos^W** y **A-Fos^W**



Los péptidos **C3**, **C4**, **C5**, $^{W9}K_4$, $^{W17}K_4$, $^{W9/17}K_4$, **Fos^W** y **A-Fos^W** liofilizados se disolvieron en 600 μ L de tampón HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.6. Sobre esta disolución se añadieron 400 μ L de una disolución de $TbCl_3$ (50 mM) / HCl (1 mM) y la mezcla resultante se agitó durante 2 horas. Tras comprobar por HPLC-MS que la coordinación se había producido, los péptidos se purificaron por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizaron.

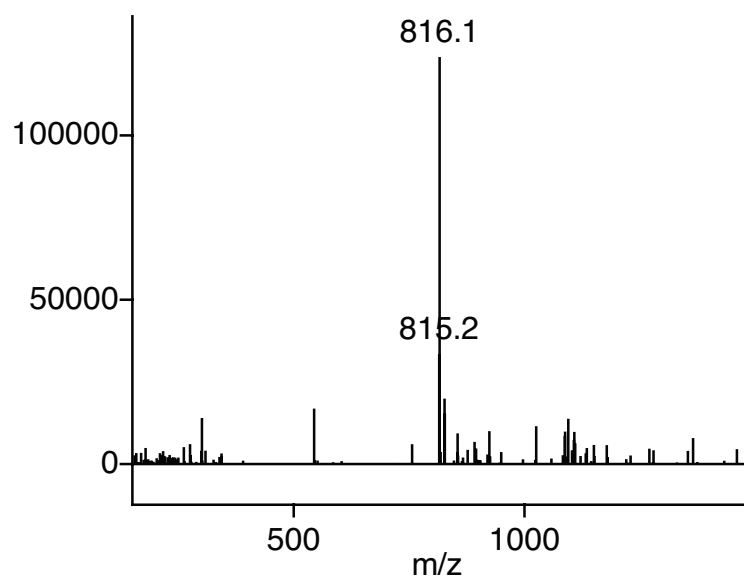
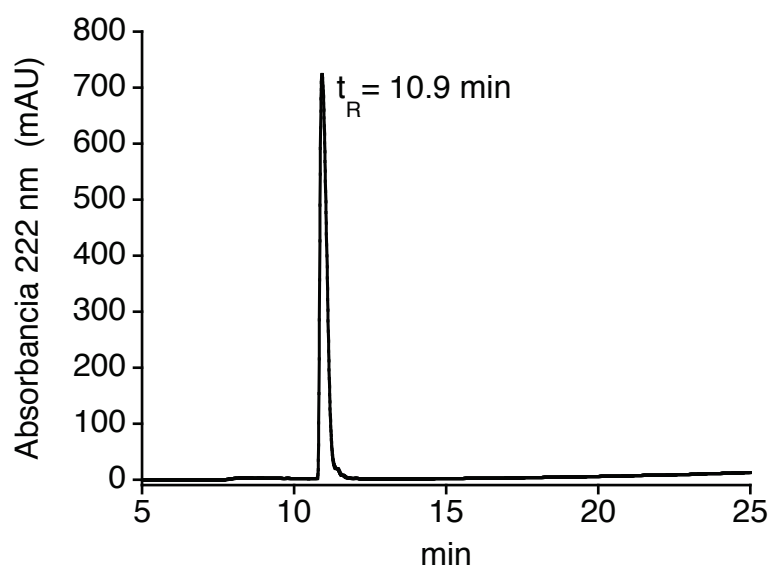
Los péptidos **C3[Tb]**, **C4[Tb]**, **C5[Tb]**, $^{W9}K_4$ [Tb], $^{W17}K_4$ [Tb], $^{W9/17}K_4$ [Tb], **Fos^W[Tb]** y **A-Fos^W[Tb]** se aislaron como sólidos de color blanco.

C3[Tb]: (3.2 mg, 13%).

$t_R = 10.9$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₅H₁₀₉N₂₁O₁₈Tb = 1630.7, encontrada = 816.1 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

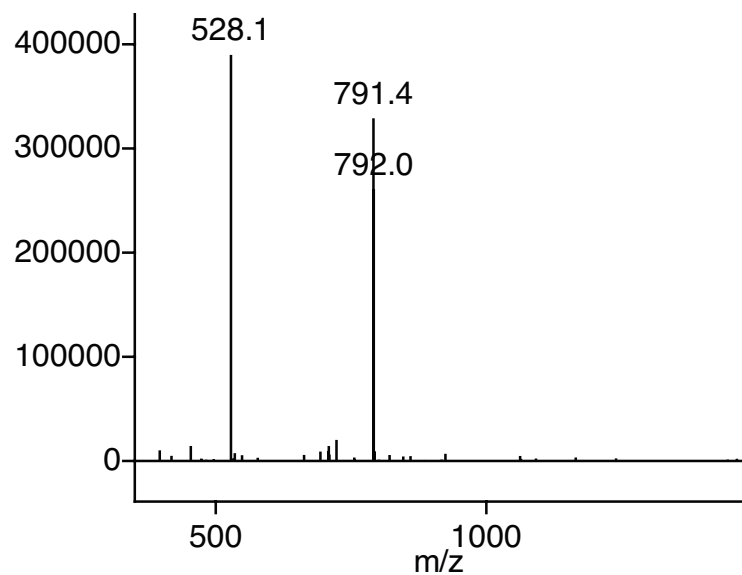
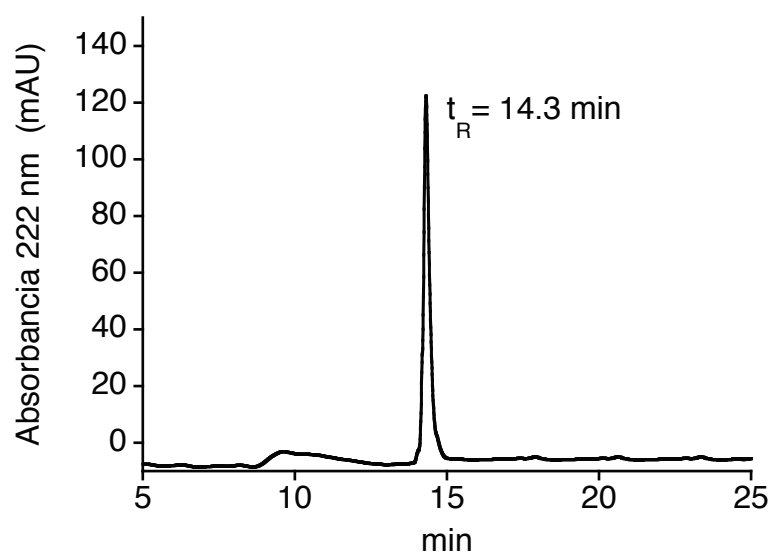


C4[Tb]: (4.0 mg, 17%).

$t_R = 14.3$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₄H₁₀₆N₂₂O₁₅Tb = 1581.7, encontrada = 791.4 [MH₂]²⁺; 528.1 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

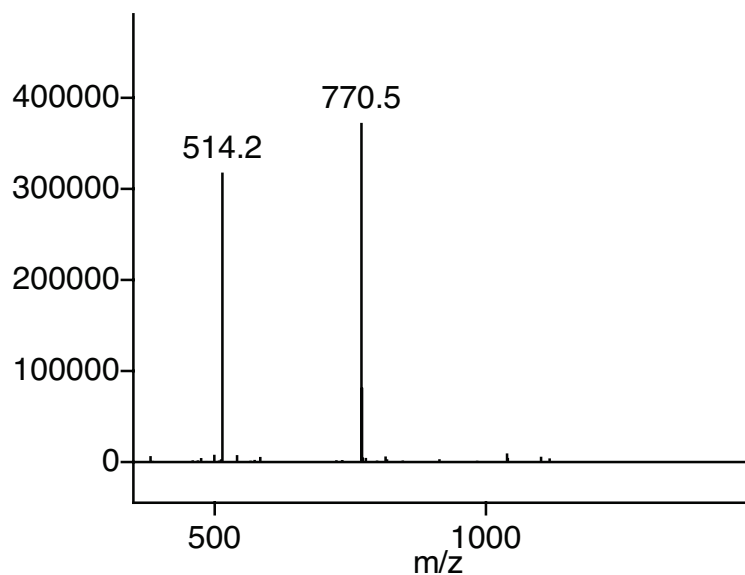
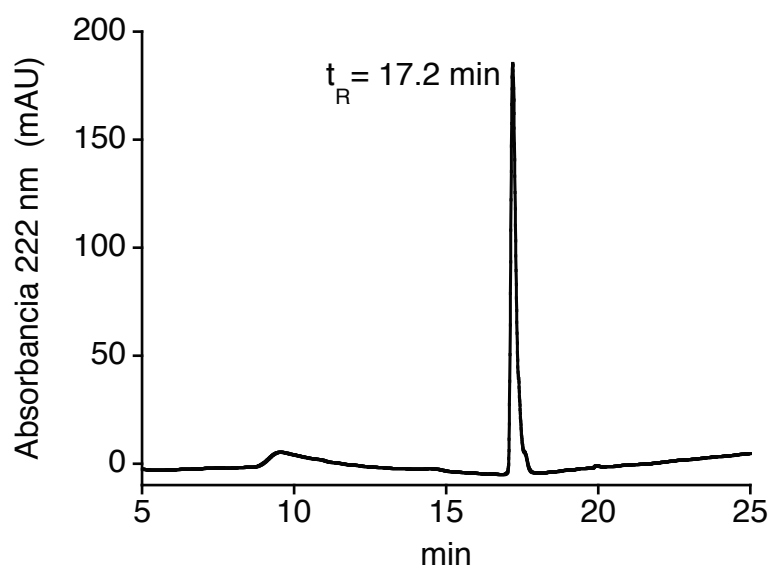


C5[Tb]: (3.5 mg, 15%).

$t_R = 17.2$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 5→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₁H₁₀₀N₂₂O₁₅Tb = 1539.7, encontrada = 770.5 [MH₂]²⁺; 514.2 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

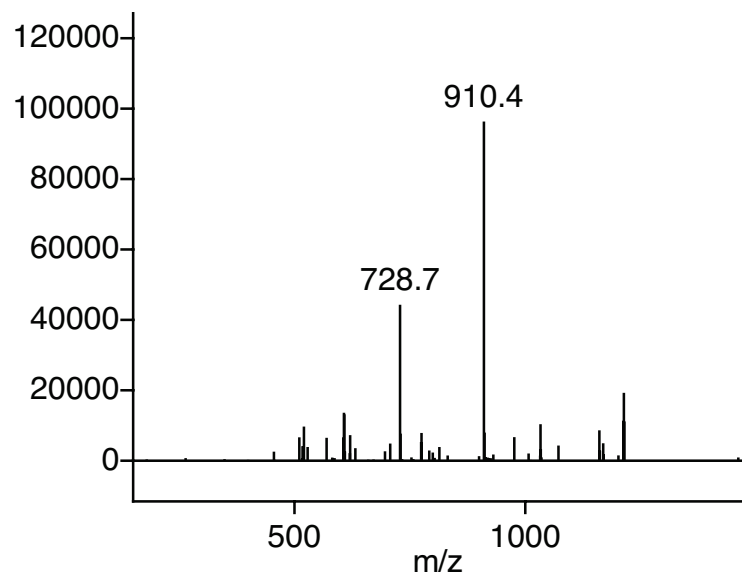
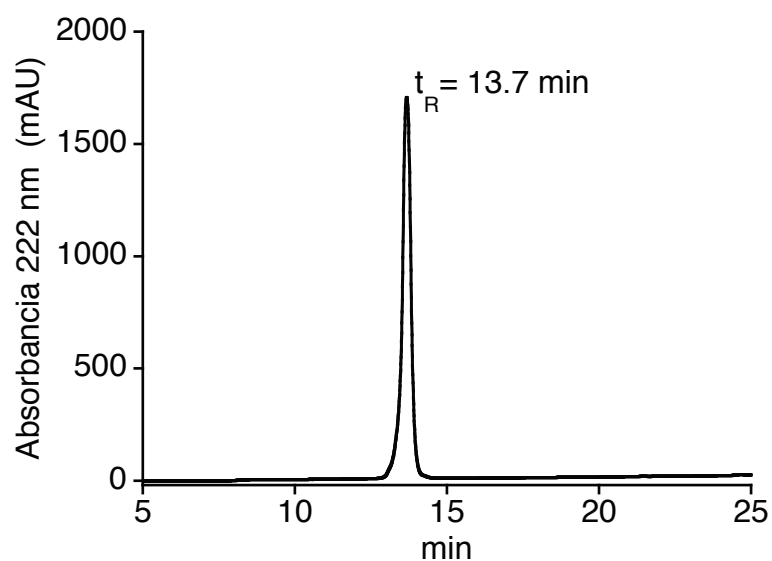


${}^{\text{w}9}\text{K}_4[\text{Tb}]$: (13 mg, 23%).

$t_{\text{R}} = 13.7$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₁₅₈H₂₇₅N₄₃O₄₄Tb = 3638.0, encontrada = 910.4 [MH₄]⁴⁺; 728.7 [MH₅]⁵⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

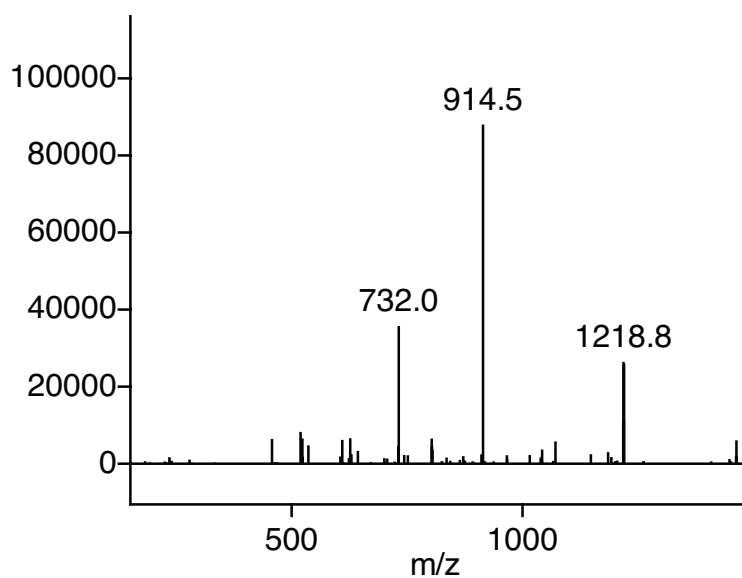
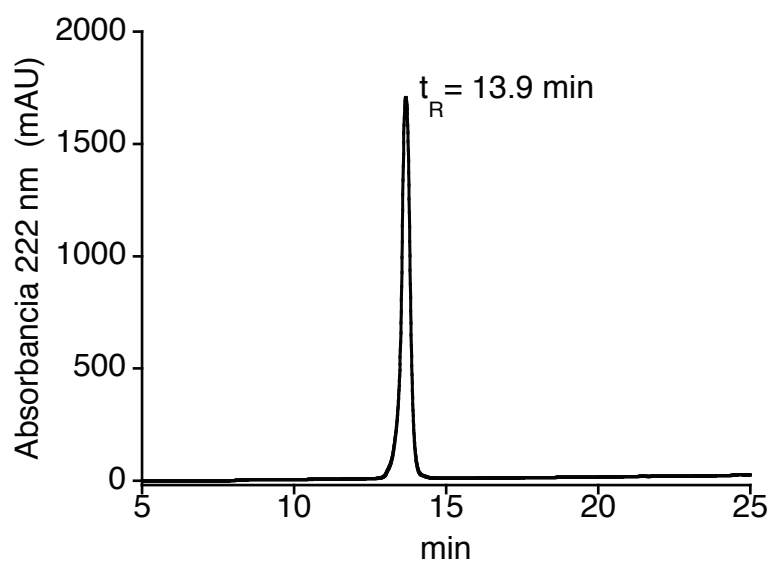


$^{w17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$: (10 mg, 18%).

$t_R = 13.9$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₁₅₈H₂₇₅N₄₃O₄₅Tb = 3654.0, encontrada = 1218.8 [MH₃]³⁺; 914.5 [MH₄]⁴⁺; 732.0 [MH₅]⁵⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

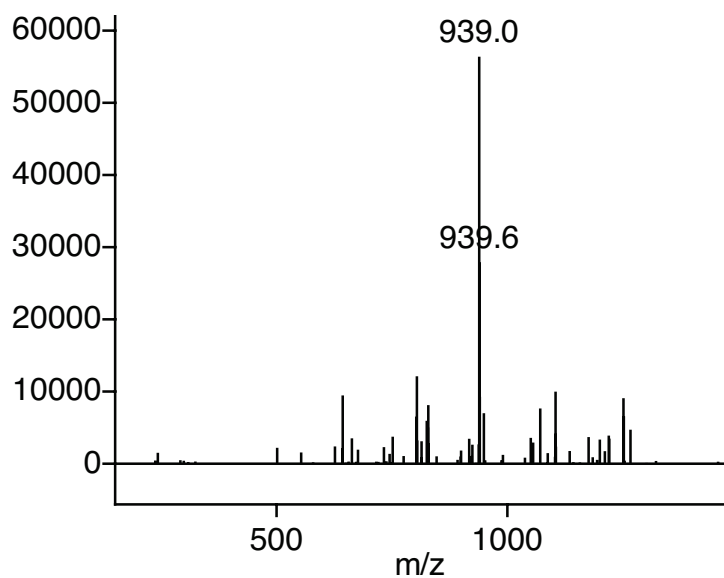
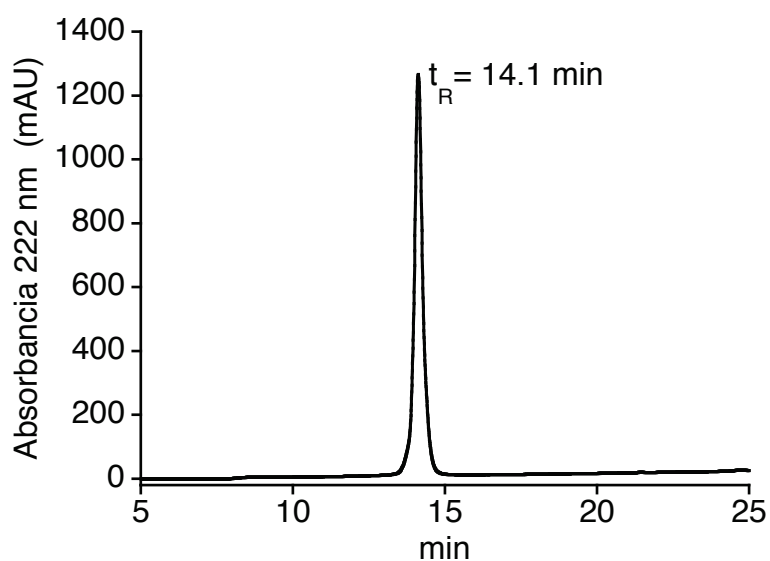


$^{w9/17}\mathbf{K}_4[\mathbf{Tb}]$: (8 mg, 14%).

$t_R = 14.1$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₁₆₆H₂₈₀N₄₄O₄₄Tb = 3753.0, encontrada = 939.0 [MH₄]⁴⁺.

UV (H₂O) λ_{\max} : 278 nm; ϵ : 11158 M⁻¹cm⁻¹.

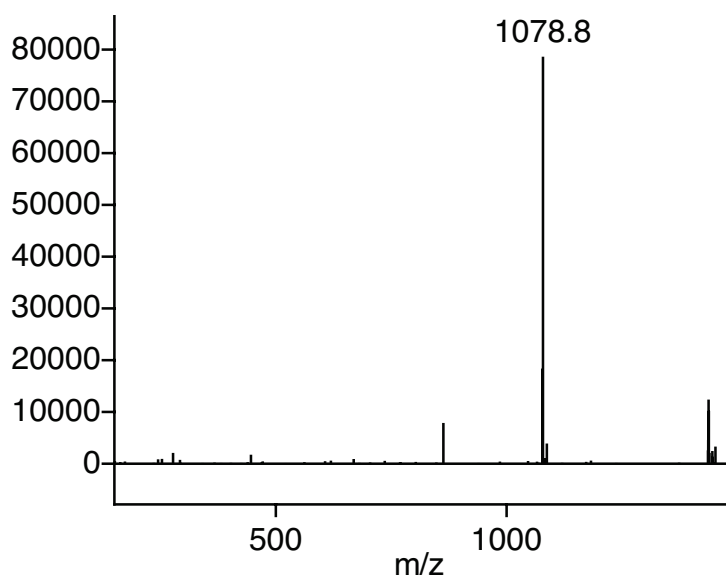
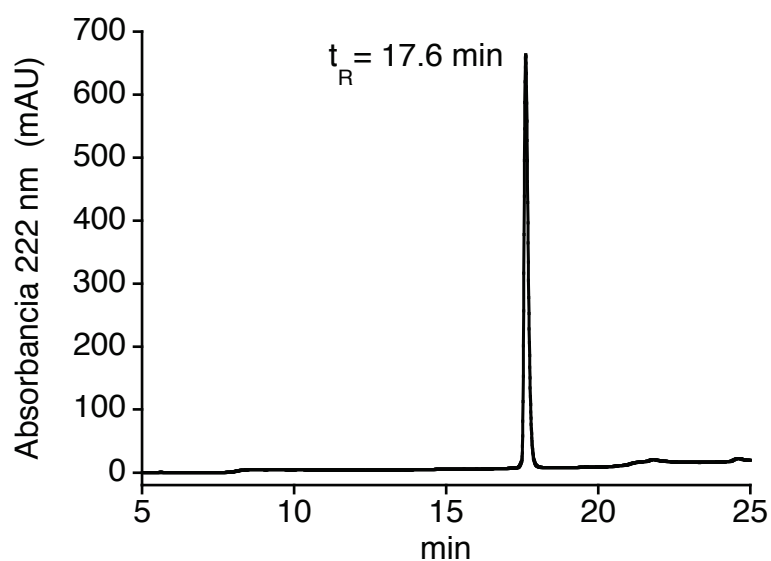


Fos^W[Tb]: (12 mg, 19%).

$t_R = 17.6$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₁₈₂H₂₉₉N₄₇O₆₃Tb = 4310.1, encontrada = 1078.8 [MH₄]⁴⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

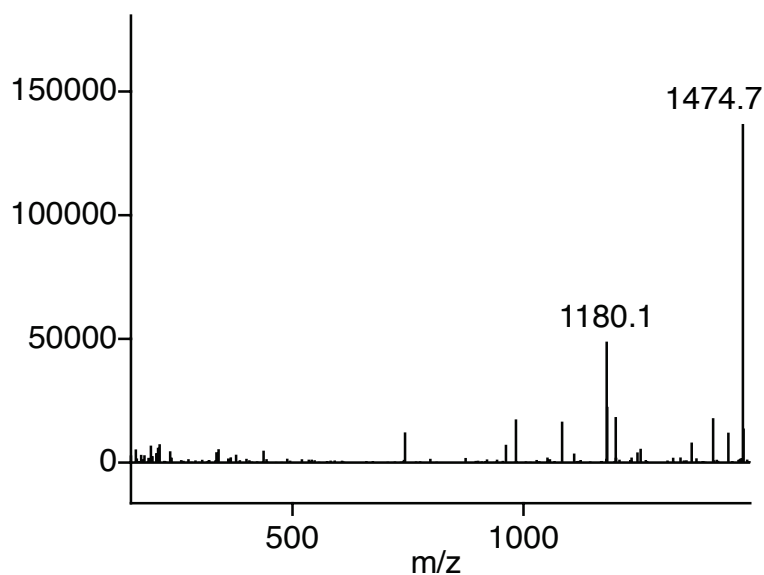
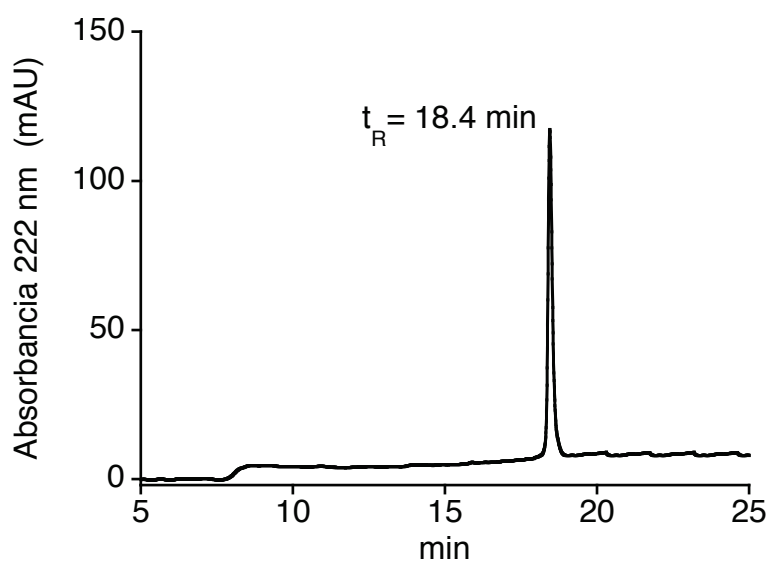


A-Fos^w[Tb]: (11 mg, 13%).

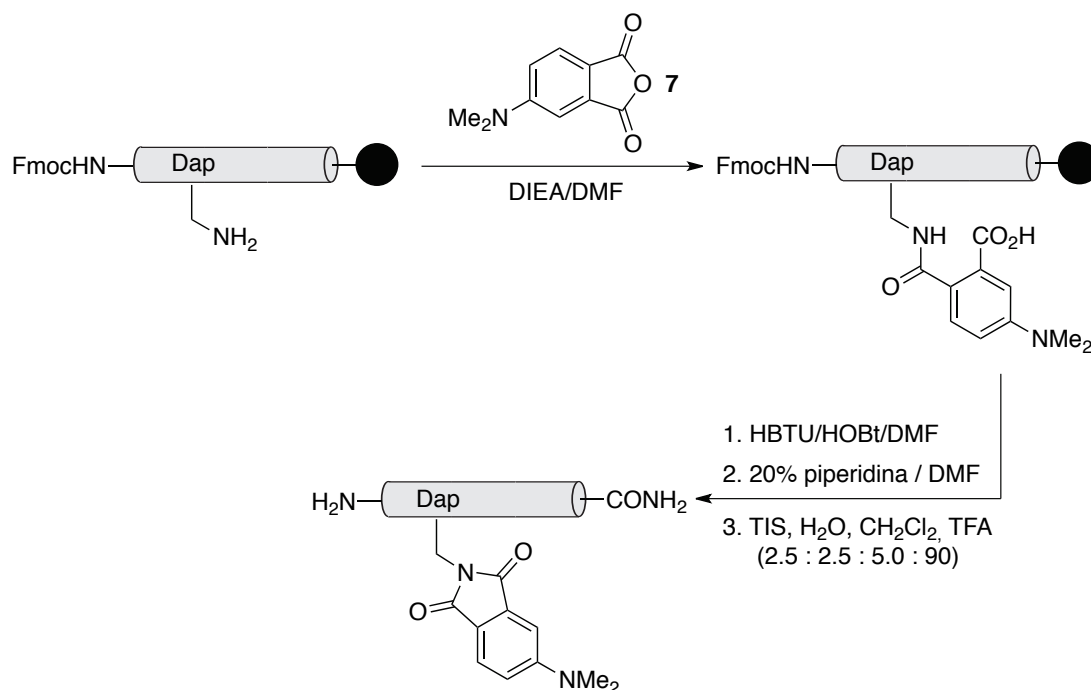
$t_R = 18.4$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₂₄₈H₄₀₂N₆₂O₉₃Tb = 5895.8, encontrada = 1474.7 [MH₄]⁴⁺; 1180.1 [MH₅]⁵⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.



Obtención de los péptidos C7a, C8a, C9a, C10a, C11a, C12a y C13a



Para la obtención del péptido **C13**, se acopló el anhídrido de 4-DMAP en el extremo amino-terminal una vez desprotegida la cadena peptídica unida a la resina por tratamiento con 20% piperidina en DMF (2.5 mL) durante 20 min y lavada con DMF (4 × 2.5 mL × 2 min). Para el resto de los péptidos el acoplamiento se realizó sobre el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de Dap.

Para ello, se añadió anhídrido 4-dimetilaminoftálico (20 mg, 0.1 mmol) y DIEA 0.195M en DMF (1 mL) sobre la resina (\approx 0.025 mmol) y se agitó durante 1 h. A continuación, se añadió una disolución de HBTU/HOBt 0.2 M en DMF (125 μ L, 0.025 mmol) y se agitó durante 12 h. Se lavó con DMF (2 × 2 mL × 2 min) y CH₂Cl₂ (2 × 2 mL × 2 min) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μ L de la mezcla de desprotección, TIS (25 μ L), H₂O (25 μ L), CH₂Cl₂ (50 μ L) y TFA (900 μ L), durante 3.5 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min.

Una vez comprobado que el 4-DMAP está acoplado al péptido, se desprotegió el extremo N-terminal en fase sólida por tratamiento con 20%

piperidina en DMF (2.5 mL) durante 20 min y se lavó la resina con DMF (4 × 2.5 mL × 2 min). A continuación se procedió a la desprotección y ruptura del péptido de la resina por tratamiento con 3 mL de la mezcla de desprotección durante 2 h. El péptido se precipitó sobre Et₂O y se separó por centrifugación. El residuo así obtenido se purificó por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizó.

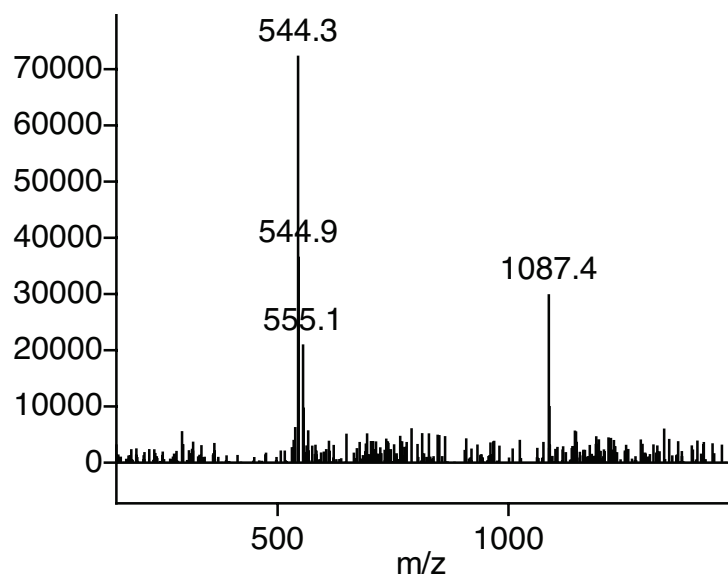
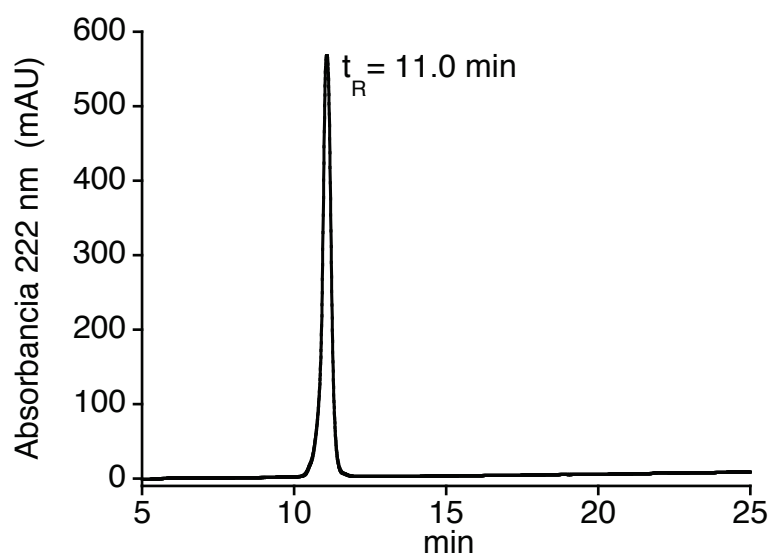
Los péptidos **C7a**, **C8a**, **C9a**, **C10a**, **C11a**, **C12a** y **C13a** se aislaron como sólidos de color amarillo intenso.

C7a: (5.2 mg, 19%).

$t_R = 11.0$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₇H₇₉N₁₈O₁₂ = 1087.6, encontrada = 1087.4 [MH]⁺; 555.1 [MHNa]²⁺; 544.3 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 421 nm; ϵ : 6480 M⁻¹cm⁻¹.

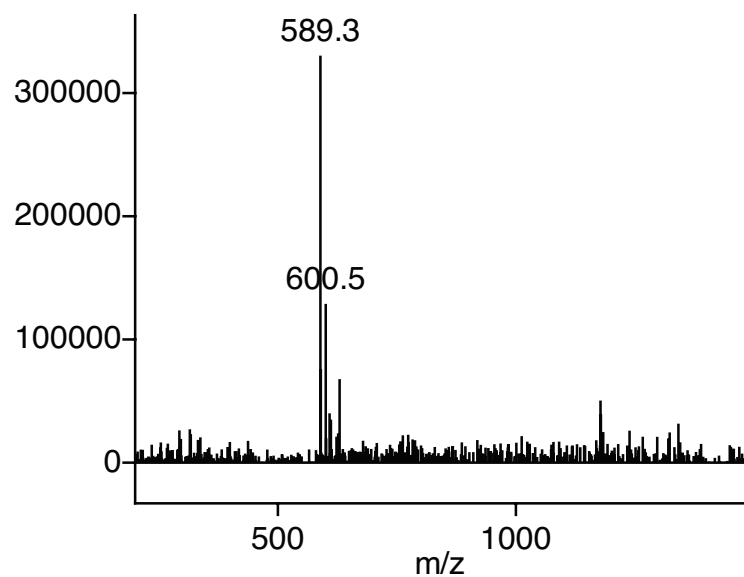
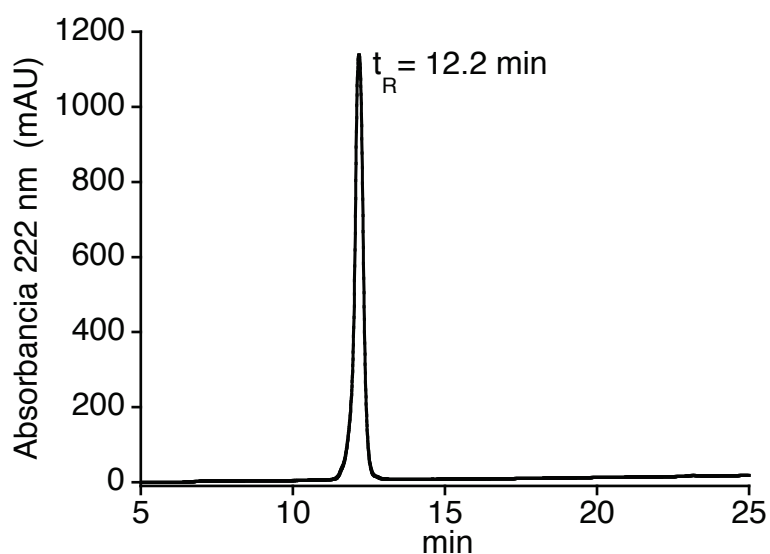


C8a: (7.4 mg, 25%).

$t_R = 12.2$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₅₄H₈₅N₁₈O₁₂ = 1177.6, encontrada = 600.5 [MHNa]²⁺; 589.3 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 421 nm; ϵ : 6480 M⁻¹cm⁻¹.

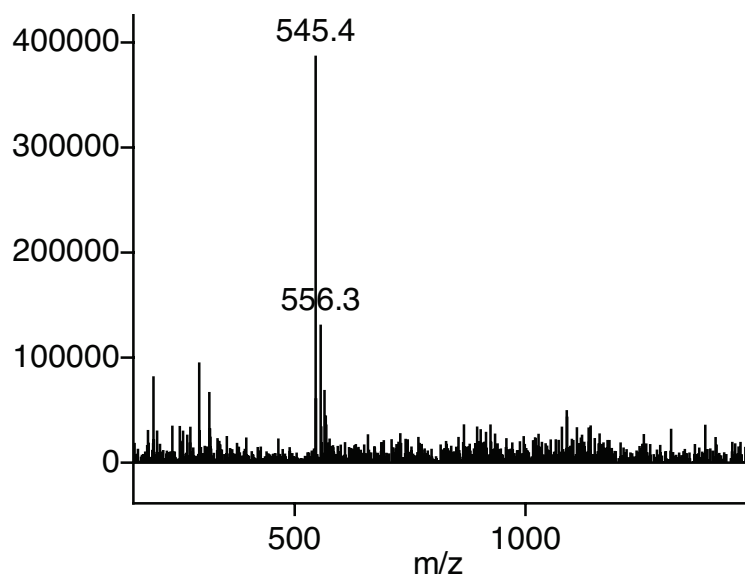
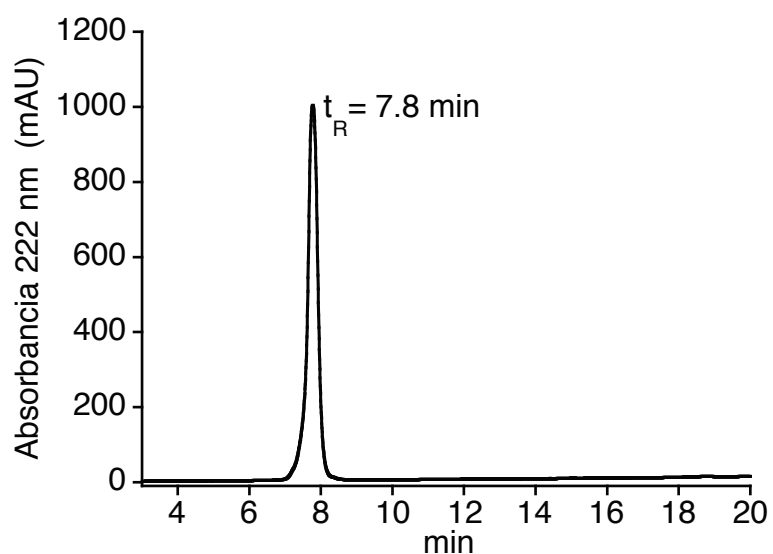


C9a: (5.4 mg, 20%).

$t_R = 7.8$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₅H₇₃N₁₈O₁₄ = 1089.5, encontrada = 556.3 [MHNa]²⁺; 545.4 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 421 nm; ϵ : 6480 M⁻¹cm⁻¹.

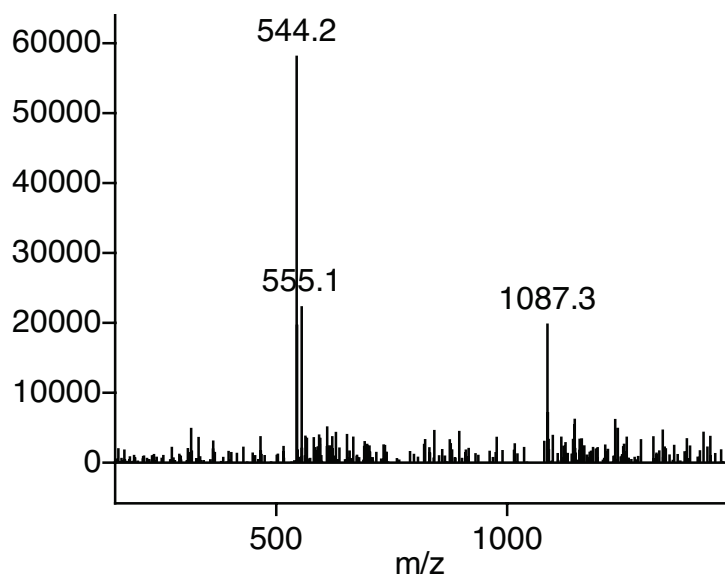
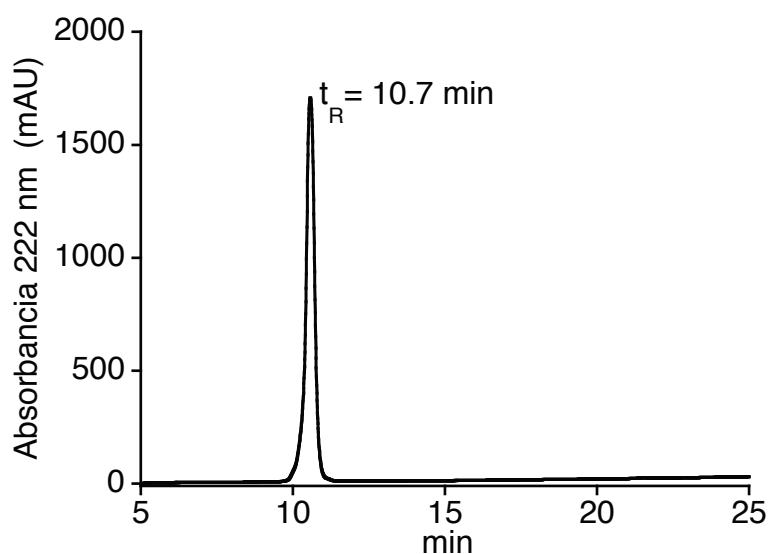


C10a: (7.0 mg, 26%).

$t_R = 10.7$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₇H₇₉N₁₈O₁₂ = 1087.6, encontrada = 1087.3 [MH]⁺; 555.1 [MHNa]²⁺; 544.2 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 421 nm; ϵ : 6480 M⁻¹cm⁻¹.

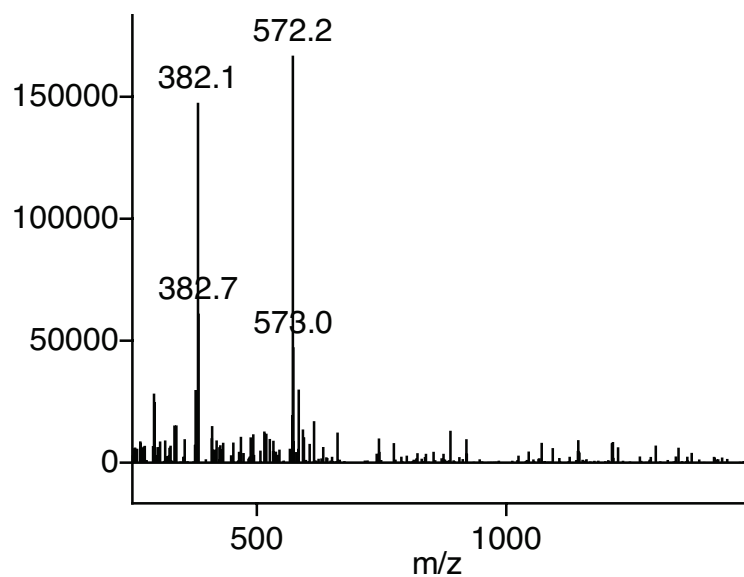
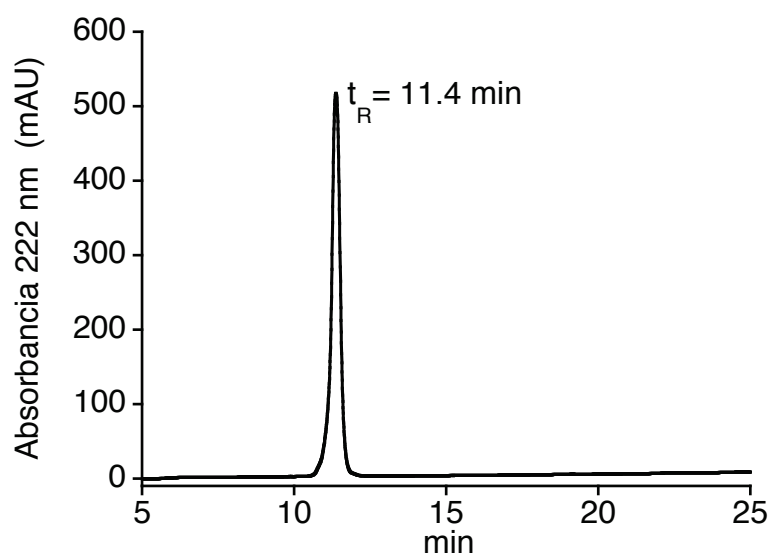


C11a: (5.1 mg, 18%).

$t_R = 11.4$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₅₁H₈₇N₁₈O₁₂ = 1143.7, encontrada = 572.2 [MH₂]²⁺; 382.1 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 421 nm; ϵ : 6480 M⁻¹cm⁻¹.

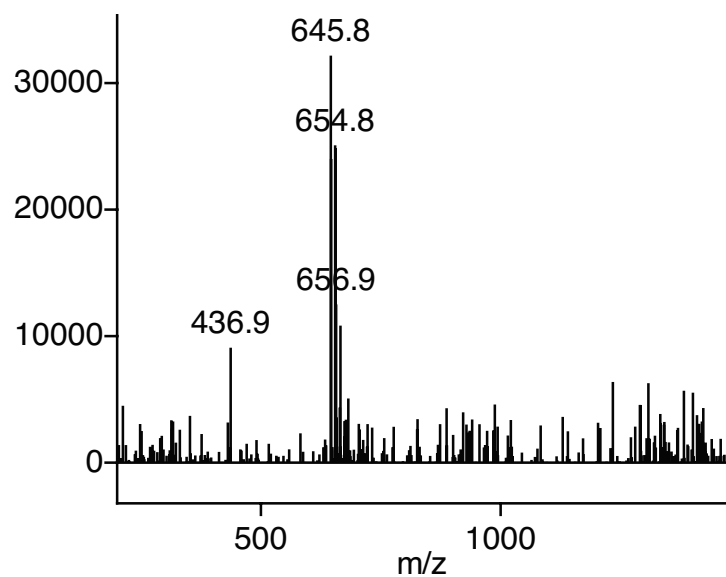
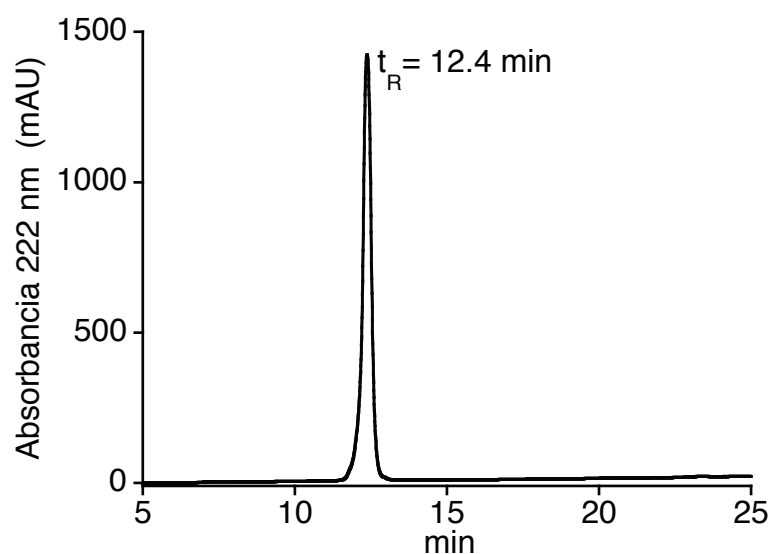


C12a: (9.3 mg, 29%).

$t_R = 12.4$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₆₀H₉₆N₁₉O₁₃ = 1290.7, encontrada = 645.8 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 421 nm; ϵ : 6480 M⁻¹cm⁻¹.

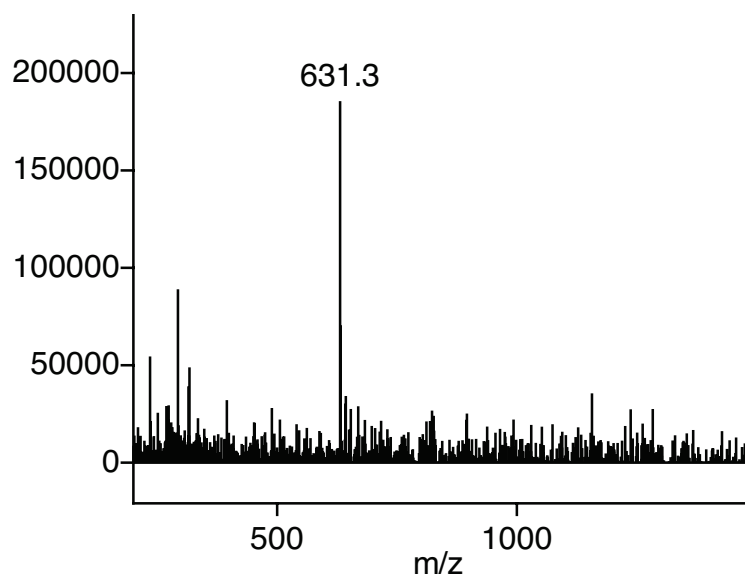
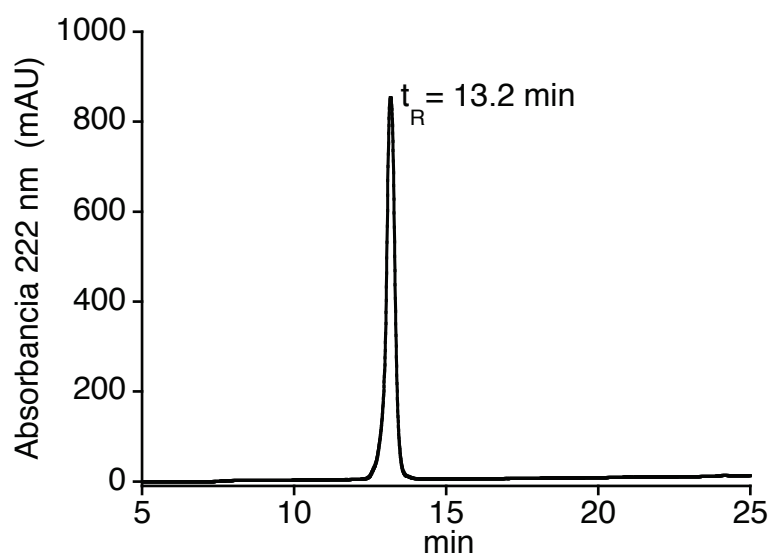


C13a: (7.2 mg, 23%).

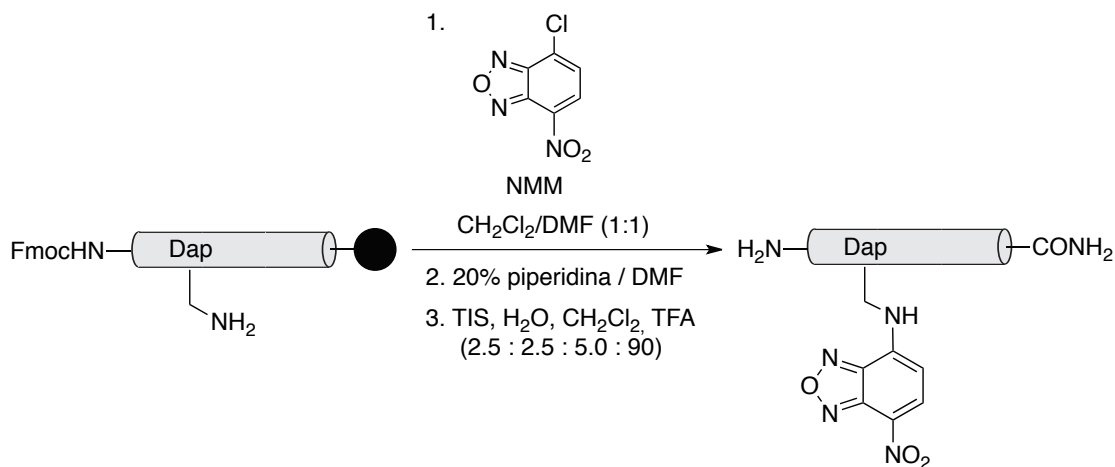
$t_R = 13.2$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₅₉H₉₄N₁₉O₁₃ = 1261.7, encontrada = 631.3 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 421 nm; ϵ : 6480 M⁻¹cm⁻¹.



Obtención de C7b, C8b, C9b y C10b



Para el acoplamiento del NBD sobre el grupo amino ortogonalmente desprotegido, se añadió Cl-NBD (50 mg, 0.25 mmol) disuelto en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (1:1) (2.5 mL) sobre la resina (≈ 0.025 mmol). A continuación se añadió la NMM (28 μL , 0.25 mmol) y la mezcla se agitó durante 12 h. La resina se lavó con DMF (2×3 mL $\times 2$ min) y CH_2Cl_2 (2×3 mL $\times 2$ min) y se secó bajo corriente de Ar.

El producto de la reacción se comprobó por desprotección de una pequeña alícuota de la resina mediante tratamiento con 150 μL de la mezcla de desprotección, TIS (25 μL), H_2O (25 μL), CH_2Cl_2 (50 μL) y TFA (900 μL), durante 3.5 h y su posterior análisis por HPLC-MS en gradiente 15 \rightarrow 95% CH_3CN , 0.1% TFA / H_2O , 0.1% TFA en 30 min.

Una vez comprobado que el NBD se había acoplado al péptido, se desprotegió en fase sólida el extremo N-terminal por tratamiento con 20% piperidina en DMF (2.5 mL) durante 20 min y se lavó la resina con DMF (4×2.5 mL $\times 2$ min). A continuación se procedió a la desprotección y ruptura del péptido de la resina por tratamiento durante 2 h con 3 mL de la mezcla de desprotección. El péptido se precipitó sobre Et_2O y se separó por centrifugación. El residuo se purificó por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizó.

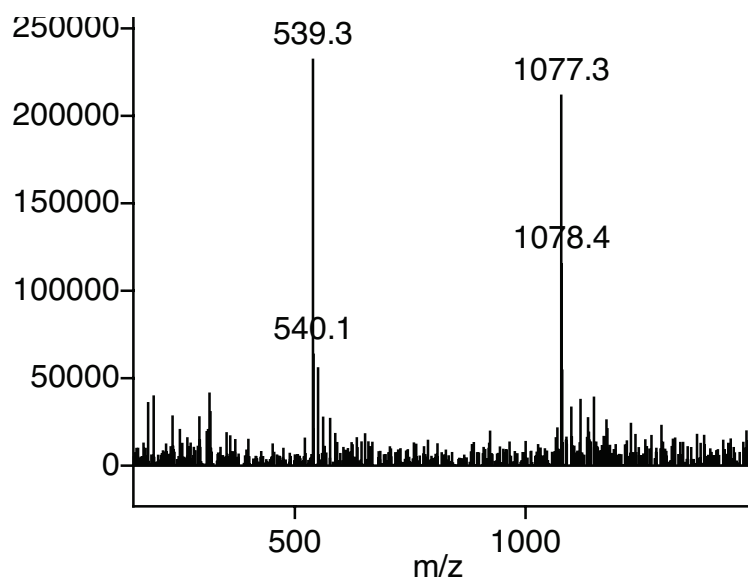
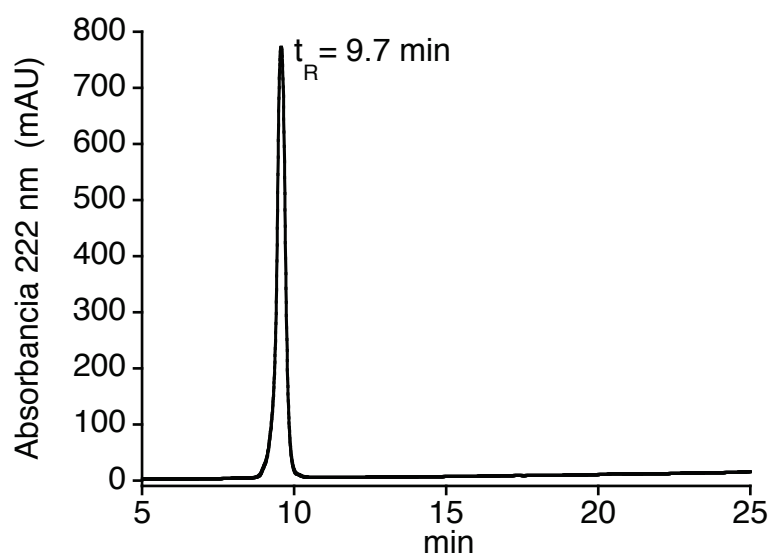
Los péptidos **C7b**, **C8b**, **C9b** y **C10b** se aislaron como sólidos de color blanco.

C7b: (7.5 mg, 28%).

$t_R = 9.7$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₃H₇₃N₂₀O₁₃ = 1077.6, encontrada = 1077.3 [MH]⁺; 539.3 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 475 nm; ϵ : 17400 M⁻¹cm⁻¹.

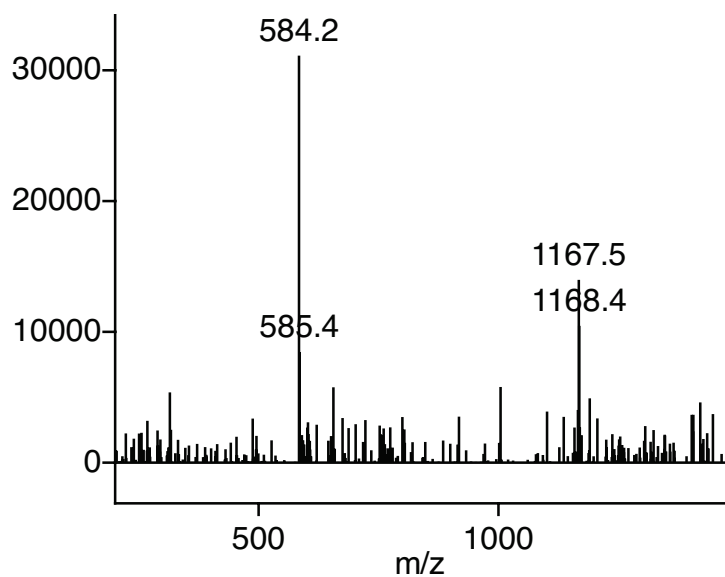
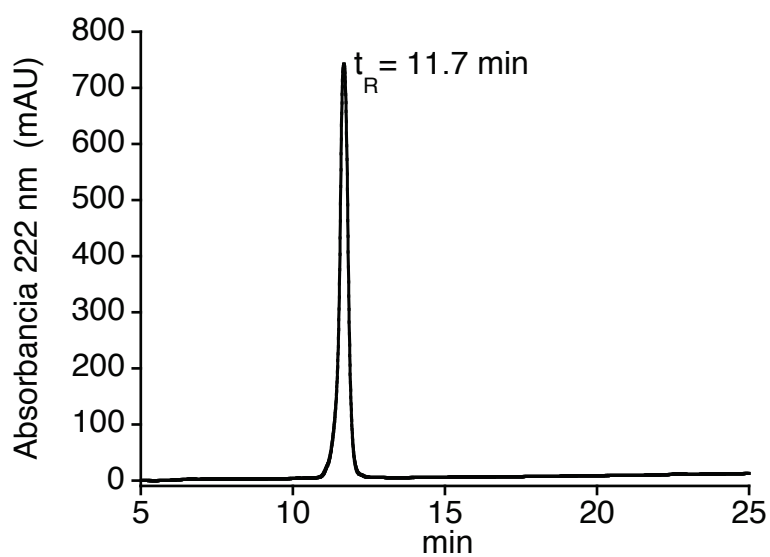


C8b: (7.0 mg, 24%).

$t_R = 11.7$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₅₀H₇₉N₂₀O₁₃ = 1167.6, encontrada = 1167.5 [MH]⁺; 584.2 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 475 nm; ϵ : 17400 M⁻¹cm⁻¹.

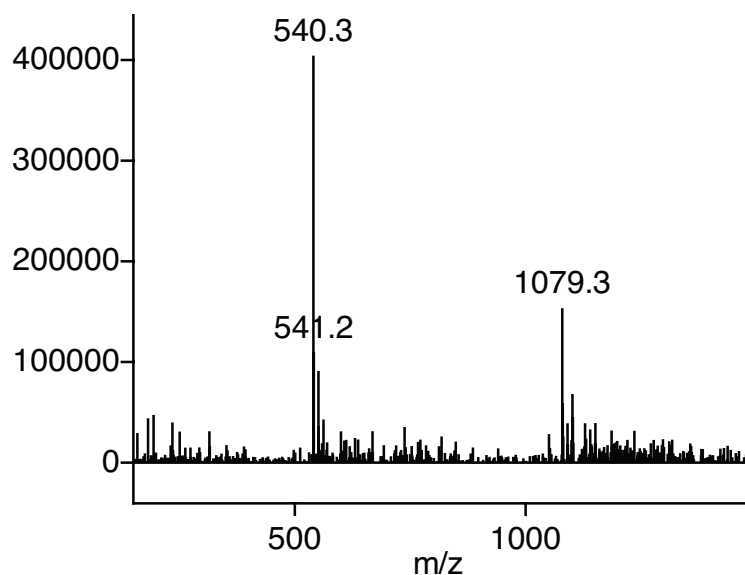
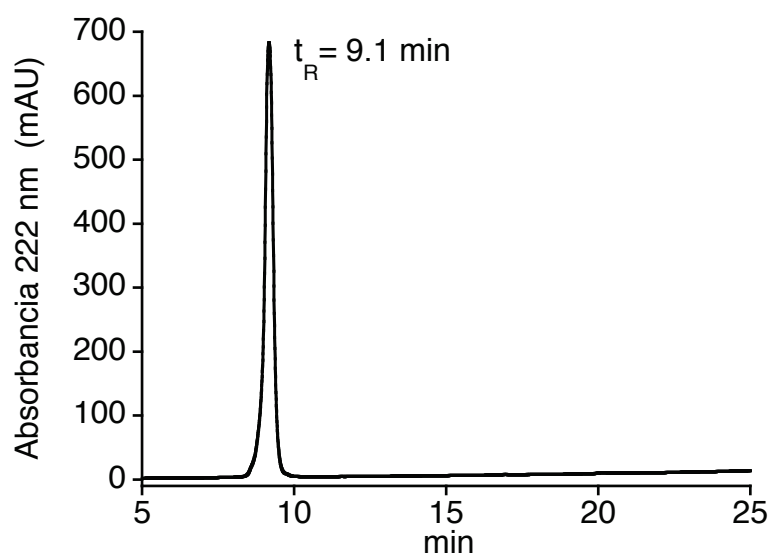


C9b: (7.3 mg, 27%).

$t_R = 9.1$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₁H₆₇N₂₀O₁₅ = 1079.5, encontrada = 1079.3 [MH]⁺; 540.3 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 475 nm; ϵ : 17400 M⁻¹cm⁻¹.

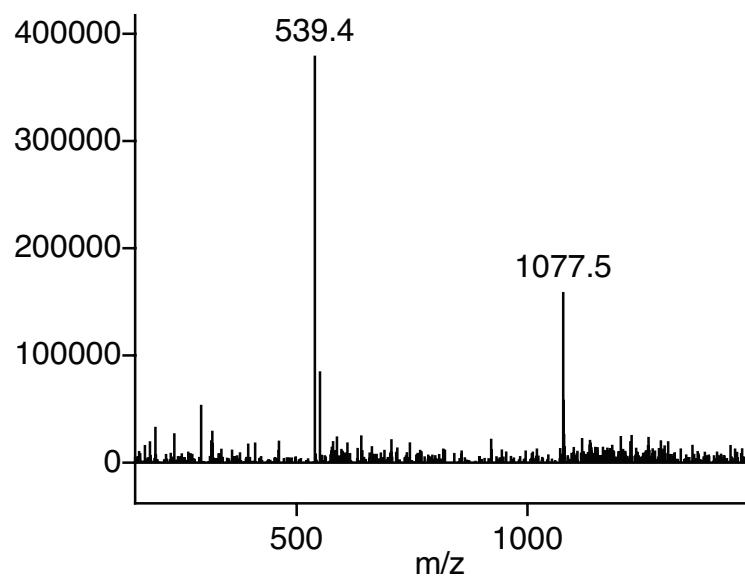
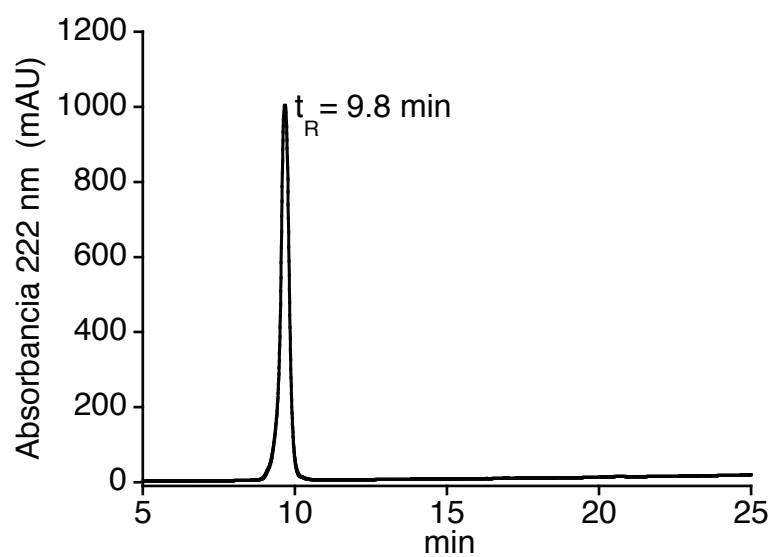


C10b: (6.2 mg, 23%).

$t_R = 9.8$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₃H₇₃N₂₀O₁₃ = 1077.6, encontrada = 1077.5 [MH]⁺; 539.4 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 475 nm; ϵ : 17400 M⁻¹cm⁻¹.



Síntesis de los péptidos no modificados **I1**, **I2**, **I3**, **E₄**, **c-Fos** y **c-Jun**

Los péptidos **I1**, **I2**, **I3**, **E₄** y **c-Fos** se sintetizaron en un sintetizador de péptidos en una escala de 0.05 mmol unidos a la resina PAL-PEG-PS siguiendo para ello el protocolo general de síntesis de péptidos en fase sólida ya descrito. **c-Jun** se obtuvo de Eurogentec y sobre el extremo amino-terminal se acopló un residuo de fenilalanina siguiendo el procedimiento ya descrito para acoplamiento en fase sólida.

0.05 mmol de los péptidos unidos a la resina PAL-PEG-PS se trataron con 20% piperidina en DMF (5 mL) durante 20 min y a continuación se lavó la resina desprotegida con DMF (4 × 5 mL × 2 min).

Tras comprobar mediante análisis por HPLC-MS en gradiente lineal, 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min, que los péptidos se habían sintetizado correctamente se procedió a la desprotección y ruptura de la resina del péptido (\approx 0.02 mmol de resina) por tratamiento con 3 mL de la mezcla de desprotección (10 μ L TIS, 25 μ L EDT, 25 μ L H₂O, 940 μ L TFA para **c-Fos**; 20 μ L anisol, 30 μ L EDT, 50 μ L tioanisol, 900 μ L TFA para **c-Jun**; y 25 μ L TIS, 25 μ L H₂O, 50 μ L CH₂Cl₂, 900 μ L TFA para los demás péptidos) durante 2.5, 3.5 y 2 h respectivamente. Los péptidos se precipitaron sobre Et₂O y se separaron por centrifugación. Los péptidos obtenidos como precipitados se purificaron por HPLC en fase reversa siguiendo los procedimientos descritos previamente y a continuación se liofilizaron.

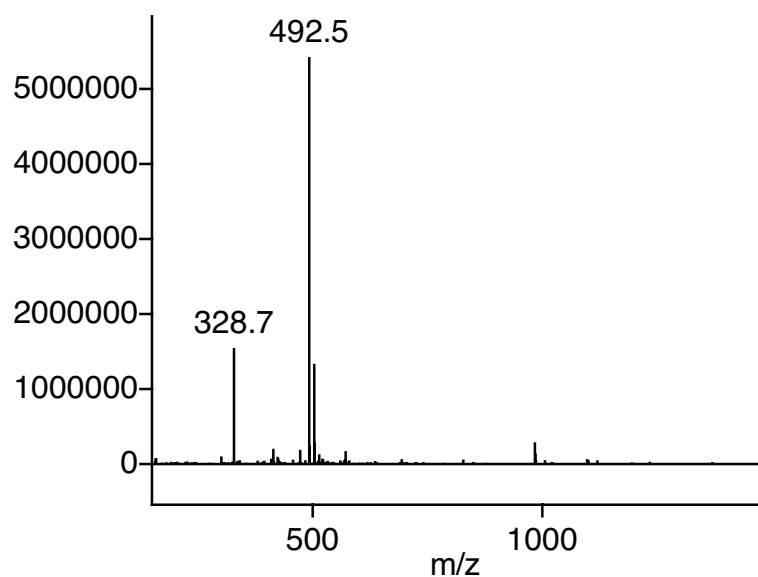
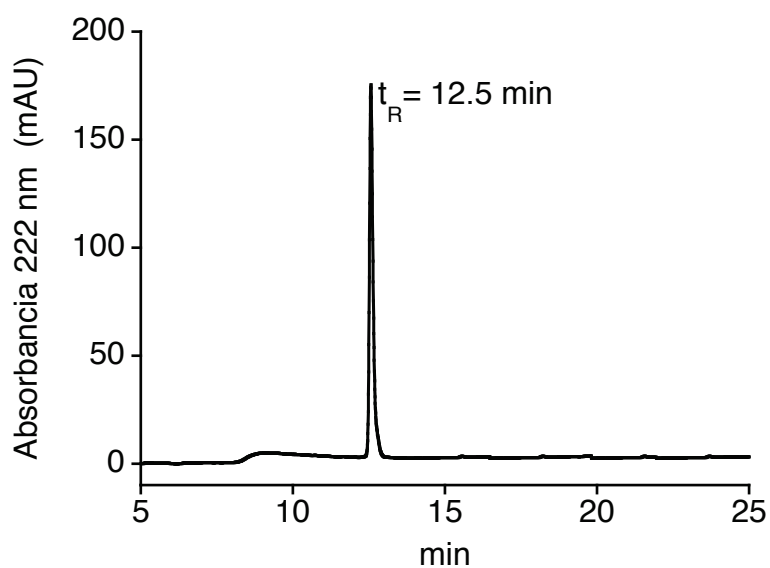
Los péptidos **I1**, **I2**, **I3**, **E₄**, **c-Fos** y **c-Jun** se aislaron como sólidos de color blanco.

I1: (6.5 mg, 33%).

$t_R = 12.5$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₄H₇₅N₁₈O₈ = 983.6, encontrada = 492.5 [MH₂]²⁺; 328.7 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

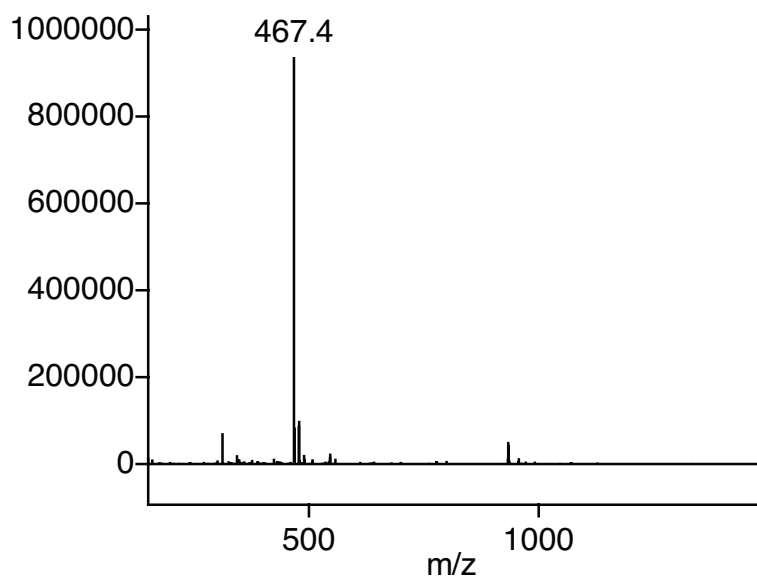
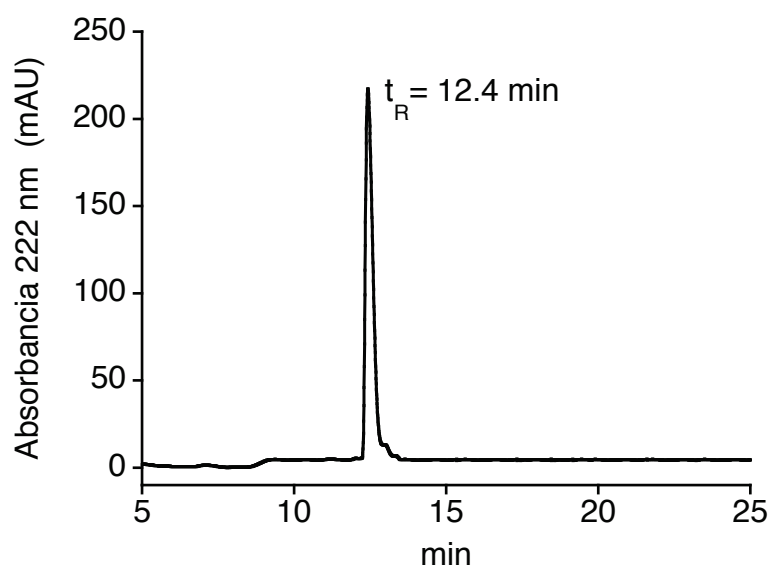


I2: (6.9 mg, 37%).

$t_R = 12.4$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₁H₇₃N₁₆O₉ = 933.6, encontrada = 467.4 [MH₂]²⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

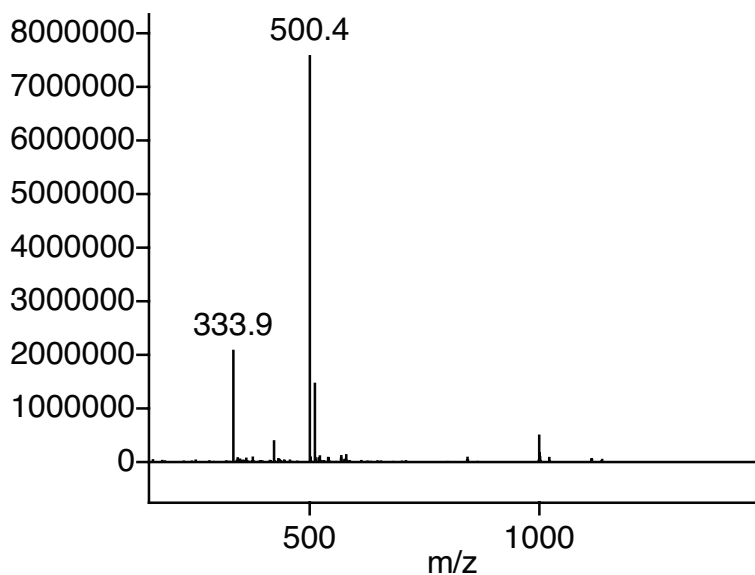
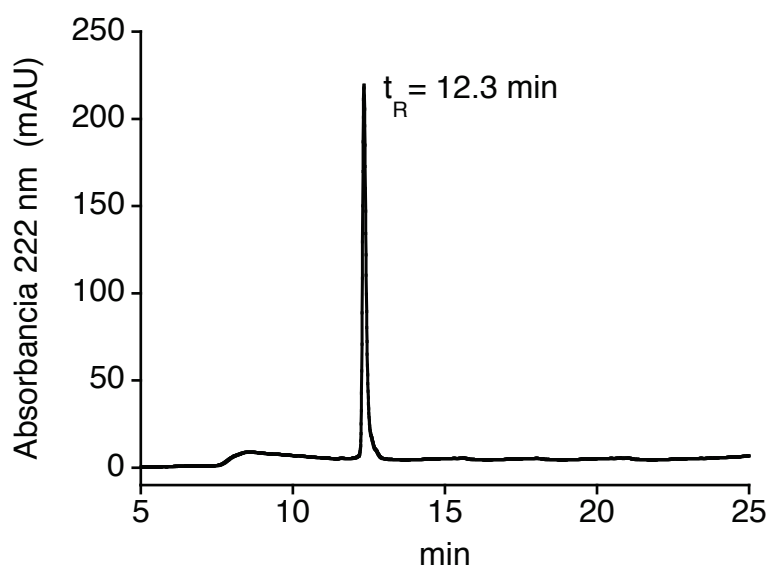


I3: (6.2 mg, 31%).

$t_R = 12.3$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₄₄H₇₅N₁₈O₉ = 999.6, encontrada = 500.4 [MH₂]²⁺; 333.9 [MH₃]³⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

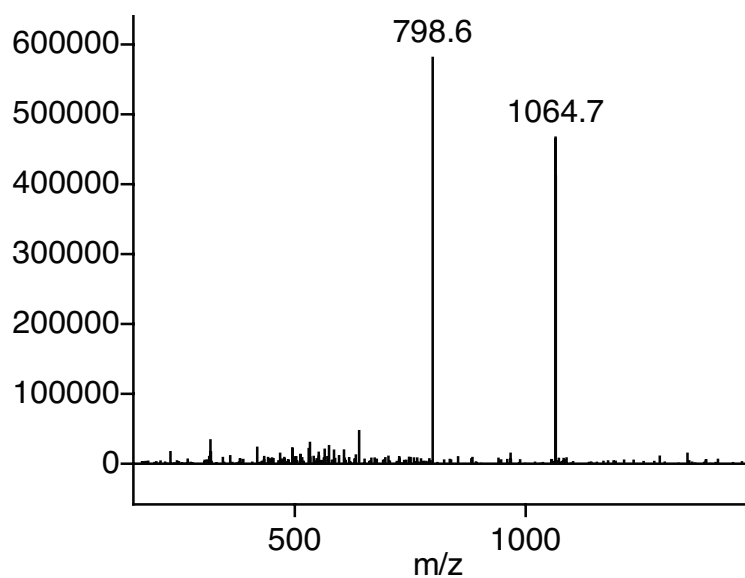
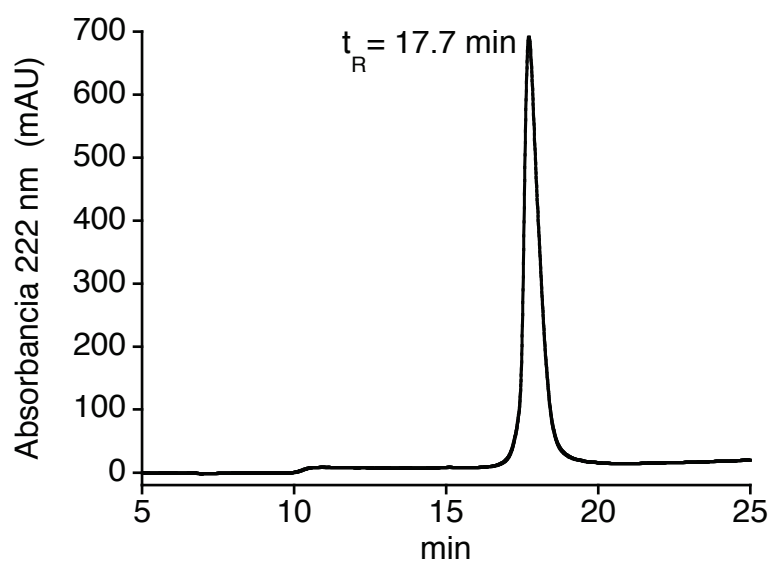


E₄: (16 mg, 26%).

$t_R = 17.7$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₁₄₁H₂₃₇N₃₄O₄₉ = 3190.7, encontrada = 1064.7 [MH₃]³⁺; 798.6 [MH₄]⁴⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.

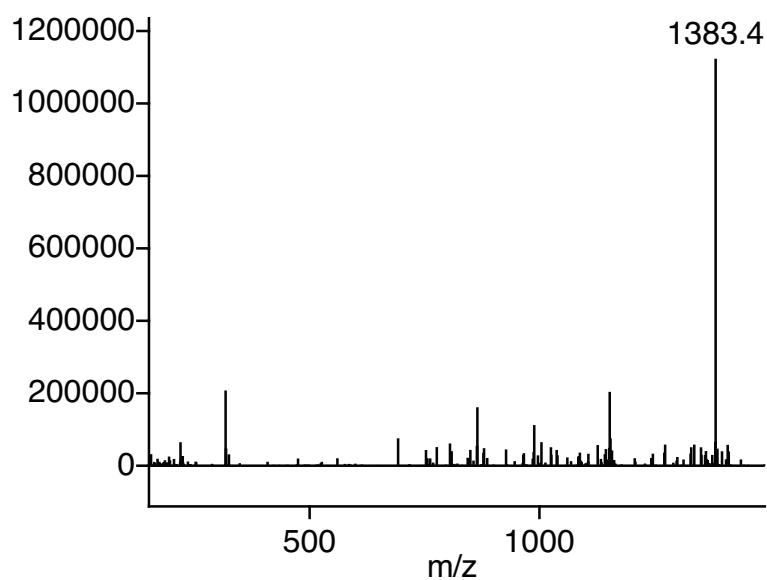
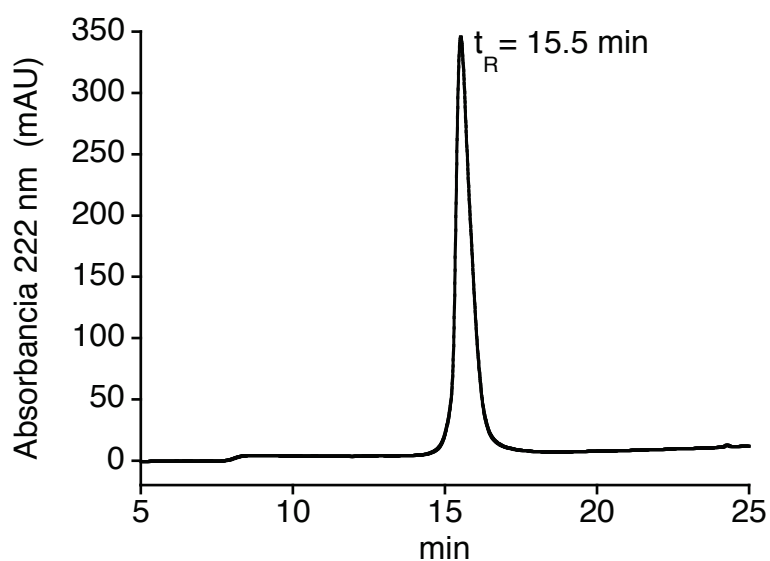


c-Fos: (33 mg, 24%).

$t_R = 15.5$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₂₉₀H₅₀₃N₉₉O₉₀S₃ = 6909.7, encontrada = 1383.4 [MH₅]⁵⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 278 nm; ϵ : 5579 M⁻¹cm⁻¹.

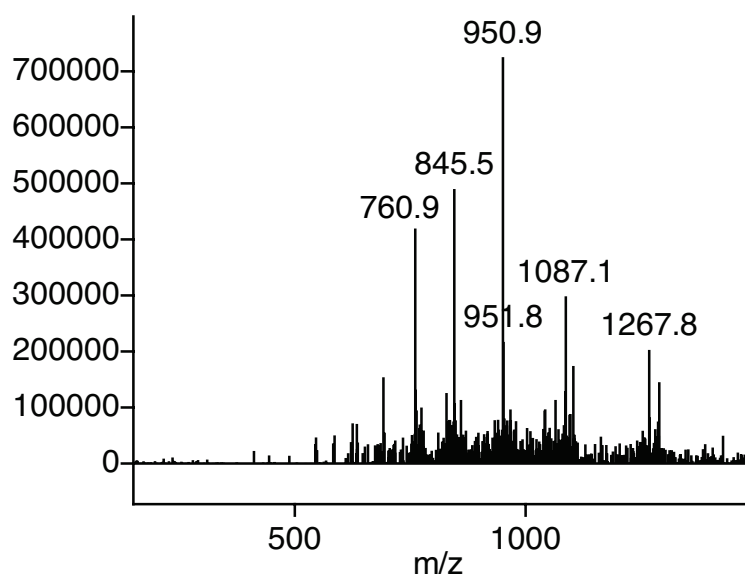
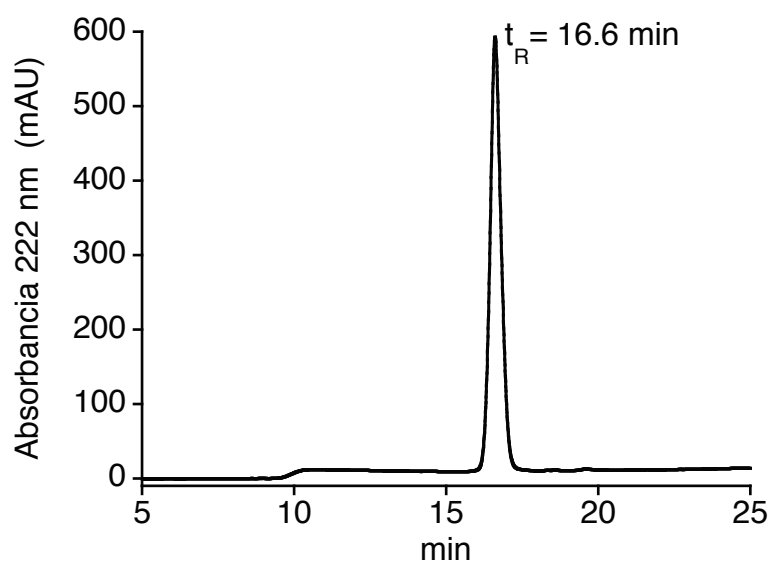


c-Jun: (42 mg, 28%).

$t_R = 16.6$ min (columna Zorbax Eclipse XDB-C₈, gradiente lineal 15→95% CH₃CN, 0.1% TFA / H₂O, 0.1% TFA en 30 min).

ESI-MS (m/z): [MH]⁺ calcd para C₃₂₅H₅₇₅N₁₁₂O₉₁S₃ = 7599.3, encontrada = 1267.8 [MH₆]⁶⁺; 1087.1 [MH₇]⁷⁺; 950.9 [MH₈]⁸⁺; 845.5 [MH₉]⁹⁺; 760.9 [MH₁₀]¹⁰⁺.

UV (H₂O) λ_{max} : 258 nm; ϵ : 195 M⁻¹cm⁻¹.



Anexos

Anexo I: Síntesis de péptidos en fase sólida

Desde su introducción por Merrifield en 1963,¹²⁵ la síntesis de péptidos en fase sólida se ha convertido en el método por excelencia para la obtención de péptidos de una manera rápida y eficiente. Esta técnica consiste en la adición secuencial a un soporte polimérico de aminoácidos α convenientemente protegidos en sus cadenas laterales, de forma tal que en cada acoplamiento se forma un nuevo enlace amida entre el extremo N-terminal de la cadena peptídica unida a la resina y el nuevo aminoácido.¹²⁶

La característica fundamental de la síntesis en fase sólida es que se lleva a cabo con el producto unido a un soporte polimérico. Dicho soporte influye en la síntesis, principalmente en función de su capacidad para solvarse y permitir de esa forma un acceso eficiente de los reactivos a los sustratos inmovilizados en la resina. Además del soporte polimérico propiamente dicho, es de gran importancia el conector o espaciador que proporciona una unión reversible entre el péptido sintético con la resina y, al mismo tiempo, protege el extremo C-terminal durante el proceso de la elongación de la cadena. El conector determina también la funcionalidad que resulta al final en dicho extremo.

Para que se puedan llevar a cabo los acoplamientos de manera efectiva, las cadenas laterales de los aminoácidos se protegen permanentemente durante toda la síntesis, utilizando grupos protectores que no se vean afectados por las condiciones de los acoplamientos. Los aminoácidos se van añadiendo con el grupo amino protegido de forma temporal que una vez acoplado se desprotege para realizar la siguiente etapa.

125 a) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149. b) Merrifield, R. B. *Science* **1965**, 150, 178.

126 a) Dick, F. *Acid Cleavage/Deprotection in Fmoc/t-Bu Solid-Phase Peptide Synthesis. Peptide Synthesis Protocols*; Pennington, M. W., Dunn, B. M., Eds.; Humana Press: Totowa, 1994; pp 63-72. b) Pennington, M. W.; Byrnes, M. E. *Procedures to Improve Difficult Couplings. Peptide Synthesis Protocols*; Pennington, M. W., Dunn, B. M., Eds.; Humana Press: Totowa, 1994; pp 1-16. c) Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press: Oxford, 1989. d) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press: Boca Raton, 1997.

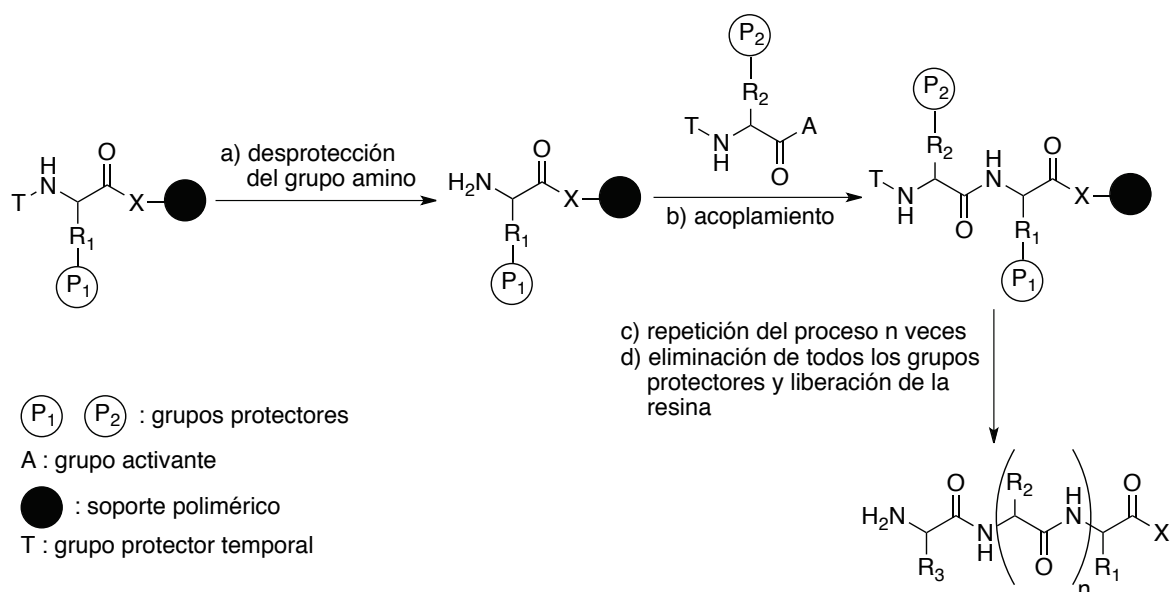


Figura 98. Esquema de la metodología para la síntesis en fase sólida. P1 y P2 son los grupos protectores ortogonales permanentes de las cadenas laterales de los aminoácidos a lo largo de toda la síntesis. T hace referencia al grupo protector temporal utilizado en el extremo N-terminal.

Existen básicamente dos metodologías para la síntesis de péptidos en fase sólida que se diferencian entre sí en la combinación de grupos protectores que utilizan. Se conocen por el nombre del grupo utilizado en la protección transitoria de los grupos amino: Boc/Bzl o Fmoc/t-Bu.¹²²

La metodología Boc/Bzl utiliza el grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc) para la protección temporal del nitrógeno α -amino de los aminoácidos y grupos del tipo bencil (Bzl) para proteger las cadenas laterales. El grupo Boc se desprotege en medio ácido por tratamiento con TFA.

La estrategia Fmoc/t-Bu hace uso del grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) como grupo N-protector temporal y grupos *tert*-butil (t-Bu) para las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales.¹²⁷ El grupo Fmoc se desprotege en medio básico con piperidina.

Los grupos protectores de las cadenas laterales generalmente se seleccionan de manera que se rompan en las mismas condiciones que las utilizadas para la liberación del péptido de la resina. En el caso de la estrategia Boc/Bzl la rotura final requiere condiciones fuertes (tratamiento con HF o ácido trifluorometanosulfónico), mientras que en el caso de la estrategia Fmoc/t-Bu es suficiente el tratamiento con TFA.

127 Fields, G. B. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161.

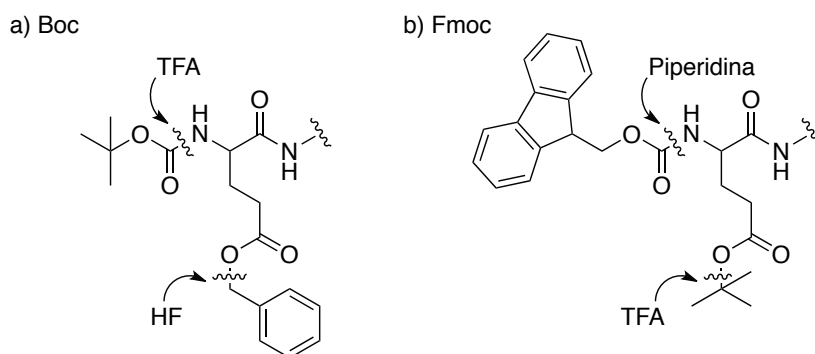


Figura 99. Roturas de los grupos protectores en las diferentes estrategias de síntesis en fase sólida.

El desarrollo de la metodología de síntesis Fmoc/t-Bu se debió fundamentalmente a los problemas que podía ocasionar en las cadenas laterales sensibles de los aminoácidos el tratamiento continuado con TFA. En la estrategia Fmoc la desprotección de los grupos amino se lleva a cabo mediante el tratamiento con una base suave y el TFA solo es necesario para la desprotección final (figura siguiente). Además, en la estrategia Boc/Bzl la desprotección final requiere el uso de HF que es altamente peligroso.

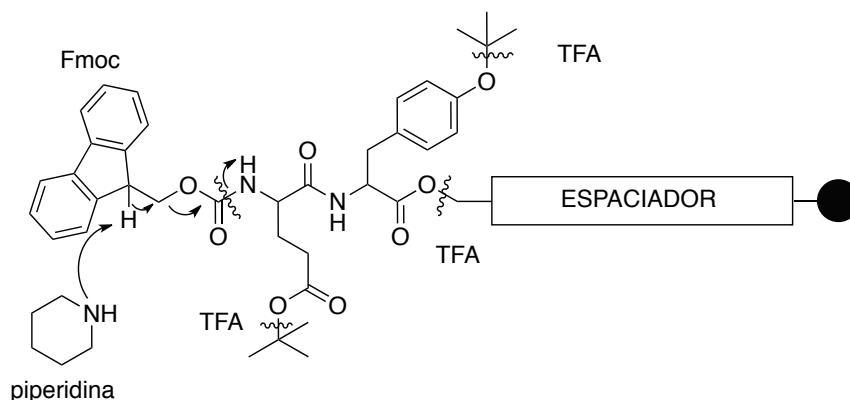
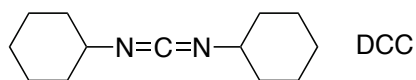


Figura 100. Reactivos y grupos protectores en la estrategia Fmoc/t-Bu. El Fmoc se desprotege por tratamiento con piperidina al 20% en DMF y las cadenas laterales se desprotegen simultáneamente a la liberación de la resina por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA).

La etapa clave de la síntesis de péptidos es la formación de los enlaces amida entre los aminoácidos. La formación eficiente de estos enlaces requiere esencialmente la activación del grupo carboxilo. Existen fundamentalmente cuatro formas distintas de llevar a cabo la activación del ácido:

- a) Carbodiimidas: Constituyen uno de los agentes activantes más extendidos. Su principal limitación es que pueden producir deshidratación de residuos de Asn y Gln, lo cual puede evitarse mediante la adición de

HOBt a la mezcla de reacción. Uno de estos agentes es la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC):



- b) *Anhídridos de ácido*: Se utilizan fundamentalmente para la síntesis Boc y normalmente se generan *in situ* utilizando dos equivalentes del aminoácido protegido y un equivalente de DCC. Este sistema es poco eficiente ya que se han de utilizar dos equivalentes del aminoácido protegido para formar la especie activada, de la cual habrá que añadir exceso.
- c) *Esteres activos*: Utilización de aminoácidos derivatizados en forma de ésteres altamente reactivos. Por ejemplo el HOBt:

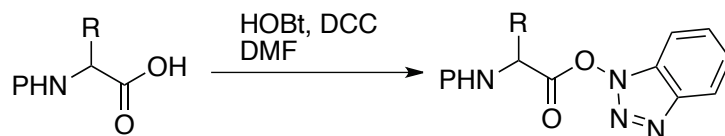


Figura 101. Preparación de un éster activo de HOBt de un aminoácido.

- d) *Formación in situ de ésteres activos*: Es el método más importante y consiste en la activación *in situ* del ácido. Su amplia utilización se ha debido a la facilidad de uso, a la capacidad de llevar a cabo reacciones limpias y rápidas, incluso entre aminoácidos con impedimentos estéricos, y la ausencia de reacciones laterales.

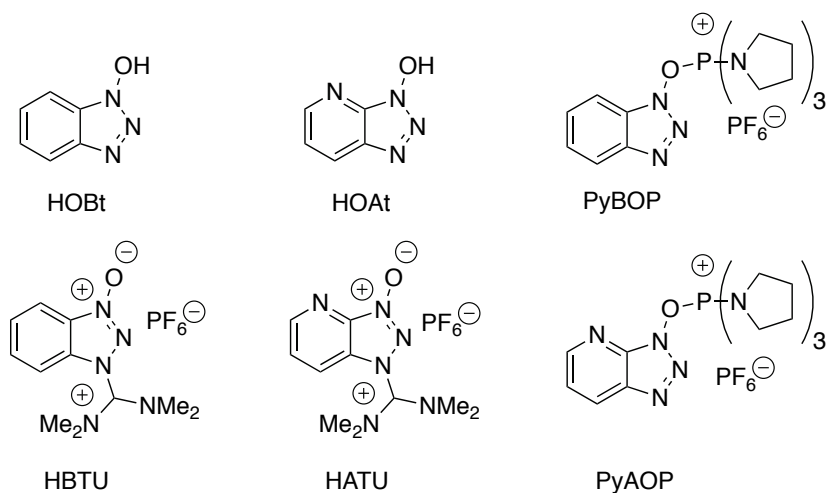


Figura 102. Agentes de acoplamiento comúnmente utilizados en síntesis en fase sólida.

El orden de reactividad de los distintos agentes es el siguiente: HATU > PyBOP \approx HBTU > DCC/HOBt > HOBt. El mecanismo de la reacción de activación se ejemplifica en el siguiente esquema para el caso del HBTU:

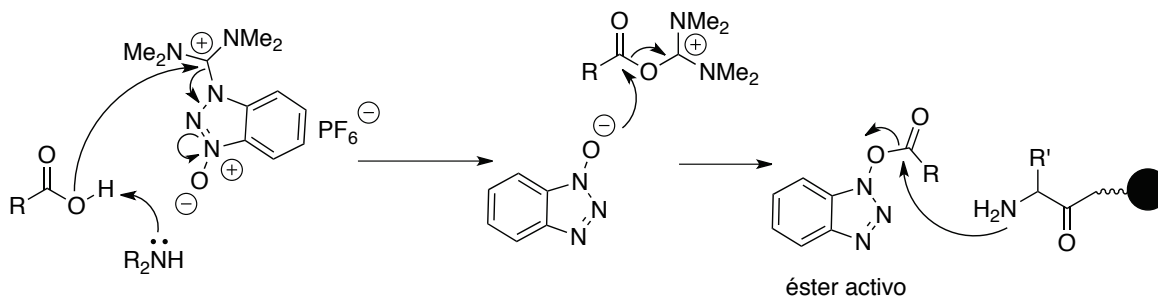


Figura 103. Activación de un ácido, formación in situ del éster activo y acoplamiento.

La síntesis en fase sólida es una técnica con grandes ventajas sobre la química clásica en disolución, fundamentalmente debido a que se pueden utilizar excesos de reactivos para garantizar que el rendimiento de cada uno de los pasos de la síntesis sea prácticamente cuantitativo. La mayor limitación proviene de la propia metodología: los productos laterales de las reacciones se irán acumulando a lo largo de toda la síntesis y la separación final del producto deseado puede ser un proceso complicado ya que, normalmente, los productos secundarios suelen tener características cromatográficas muy similares al producto deseado.

En los últimos años la síntesis lineal de péptidos se ha desarrollado enormemente, siendo en estos momentos una técnica muy eficaz para la síntesis de péptidos y proteínas pequeñas.

Anexo 2: Espectroscopía de dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD) se define como la medida de la diferencia de absorción (ΔA) entre la luz polarizada circularmente a la izquierda (A_L) y a la derecha (A_R).¹²⁸ La adaptación de la ley de Lambert-Beer para el CD sustituye el coeficiente de extinción (ϵ) por la diferencia entre los coeficientes de extinción para la absorción de la luz polarizada a la izquierda y a la derecha ($\Delta\epsilon$).

$$CD = \Delta A = A_L - A_R = \Delta\epsilon \ell C = (\epsilon_L - \epsilon_R) \ell C$$

En la mayor parte de los casos, los espectros de CD no se expresan en unidades de absorbancia, sino que normalmente se transforman a *elipticidad* en grados. La conversión entre las dos es directa:

$$\theta \text{ (grados)} = 32.982 C \ell \Delta\epsilon = 32.982 \Delta A$$

donde C es la concentración de la muestra en mol/dm^{-3} y ℓ es el paso óptico de la celda medido en cm .

La unidad más común para los espectros de CD es la *elipticidad molar*, medida en $^\circ \text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.

$$M_\theta = [\theta]_m = 100 \theta / C \ell = 3298.2 \Delta\epsilon$$

En el caso de péptidos y proteínas se suele utilizar la *elipticidad molar por residuo* (*mre*), que se calcula directamente a partir de la *elipticidad molar* dividiendo su valor entre el número de residuos del péptido o la proteína.

El CD es especialmente útil para el estudio de moléculas quirales, entre las cuales se encuentran prácticamente todas las moléculas de interés biológico. De hecho, la utilización del CD como técnica de análisis estructural está ampliamente extendida para el estudio de sistemas biológicos, a pesar de que las moléculas implicadas normalmente son muy grandes y no es posible un análisis detallado de los espectros de CD obtenidos.

Las moléculas aquirales no dan señal en el CD sin embargo, su complejación con macromoléculas quirales provoca cambios conformacionales que inducen quiralidad en los ligandos generando así una señal inducida en CD. Dicha señal de CD inducida puede ser utilizada para caracterizar la interacción responsable

128 a) Fasman, G. D., Ed. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Plenum Press: New York, 1990. b) Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular Dichroism*; Wiley-VCH: New York, 2000.

de esa asociación. El dicroísmo circular normalmente se utiliza con dos fines: detectar cambios en la conformación de macromoléculas y detectar la interacción entre macromoléculas y moléculas pequeñas, especialmente moléculas aquirales, cuya señal de CD inducida se deberá exclusivamente a su interacción con la macromolécula.¹²⁹

Si se llevan a cabo una serie de espectros de CD en donde se va cambiando alguna variable (concentración de ligando, fuerza iónica, temperatura...) y se observa un cambio en la intensidad de la señal de CD pero la forma del espectro permanece constante, se puede deducir que el modo de unión del ligando permanece constante con respecto a la variable que se ha ido cambiando. Por el contrario, si se produce un cambio de forma en el espectro a medida que se cambia la proporción de ligando o cualquier otra variable, se puede concluir que existe un cambio en el tipo de interacción entre el ligando y la macromolécula. Normalmente, ese cambio es debido a la ocupación de más de un sitio de unión a medida que aumenta la proporción de ligando respecto a la de macromolécula.

Dicroísmo circular de péptidos y proteínas

Todos los aminoácidos naturales tienen la misma quiralidad (excepto la Gly, que es aquiral). Como resultado de esta quiralidad, las estructuras secundarias formadas también son quirales y por lo tanto tienen señales características de CD. De los espectros de CD de péptidos y proteínas se puede deducir información tanto de la conformación de las cadenas laterales como del esqueleto.

Para su análisis, los espectros de CD normalmente se dividen en dos regiones diferentes: el UV cercano y el UV lejano. El UV cercano comprende aproximadamente entre 250 y 350 nm y muchas veces también se le conoce como la región aromática del espectro. La región del UV lejano es aquella de longitud de onda inferior a 250 nm y las señales en esta zona están dominadas por las transiciones electrónicas del enlace peptídico, aunque también puede

129 a) Brittain, H. G. Circular dichroism studies of the optical activity induced in achiral molecules through association with chiral substances. *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*; Purdie, N., Brittain, H. G., Eds.; Elsevier, 1994; vol. 14, pp 307-341.
b) Hatano, M. *Advances in polymer Science*; Okamura, S., Ed.; Springer-Verlag, 1986; vol. 77.

haber contribuciones de otras transiciones. La región del UV cercano aporta información sobre todo de la estructura terciaria del péptido o proteína, en tanto que la región del UV lejano proporciona información a cerca de las estructuras secundarias presentes.

Actualmente, la interpretación de los espectros de CD de péptidos y proteínas está basada en reglas empíricas y simplificaciones teóricas como que sólo el enlace peptídico contribuye en la zona del UV lejano, que cada elemento de estructura secundaria puede ser descrito a través de un único espectro o que la contribución de la estructura terciaria en el espectro de UV lejano es despreciable.

Se considera que en ausencia de contribuciones por parte de cromóforos aromáticos, el espectro de CD de un péptido o una proteína puede ser considerado como la suma de las contribuciones de los espectros de CD correspondientes a los distintos motivos de estructura secundaria. Así, las hélices α tienen un espectro característico, lo mismo que las láminas β y las regiones sin estructura.

La hélice α es el motivo de estructura secundaria dominante en gran número de proteínas, es un elemento estructural bien definido que también es adoptado por gran número de homopolipéptidos en determinadas condiciones, por lo que su espectro de CD es bien conocido. El espectro de CD está caracterizado por una banda negativa a 222 nm y otra a 208 nm y su intensidad está directamente relacionada con el % de hélice α formada. Se ha descrito que el valor de la *elipticidad molar por residuo* correspondiente para el 100% de hélice α varía entre -33000 y -40000.¹³⁰

Las láminas β son estructuras secundarias mucho más variables que las hélices α : pueden ser paralelas o antiparalelas, con longitudes y anchuras variables y además, las láminas β suelen mostrar una torsión que depende de su longitud y que influirá en el espectro de CD. Todos estos factores hacen que la caracterización espectroscópica de las láminas β sea menos exacta. Los elementos fundamentales en el espectro de CD son la existencia de una banda

130 a) Chen, Y.-H.; Yang, J. T.; Chau, K. H. *Biochemistry* **1974**, 13, 3350. b) Padmanabhan, S.; Marqusee, S.; Ridgeway, T.; Laue, T. M.; Baldwin, R. L. *Nature* **1990**, 344, 268. c) Luo, P.; Baldwin, R. L. *Biochemistry* **1997**, 36, 8413.

negativa a 216 nm y otra banda de magnitud similar en torno a 195 nm. La intensidad del espectro de láminas β es mucho menor que el de las α -hélices.

Los péptidos desordenados poseen como principal característica una banda negativa intensa justo por debajo de 200 nm y una banda positiva en torno a 218 nm que no es totalmente general.