

El complejo “6-18 Ki-ras-Cu” un modelo para estudiar el cobre divalente en biología: I. Síntesis en fase sólida del segmento peptídico y formación del complejo

CECILIA JUAREZ-GORDIANO
Departamento de Inmunología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

ANTONIO QUIROZ-GUTIERREZ
Departamento de Sistemas Complejos
Instituto de Física
Universidad Nacional Autónoma de México

y
Departamento de Química Orgánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala
Apartado Postal 42-186
Col. Santo Tomás
11340 México, D.F.

HEBER MUÑOZ-MARTINEZ †
Departamento de Química Orgánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala
Apartado Postal 42-186
Col. Santo Tomás
11340 México, D.F.

JUÁREZ-GORDIANO, C.; A. QUIROZ-GUTIÉRREZ y H. MUÑOZ-MARTÍNEZ, 1994. El complejo “6-18 Ki-ras-Cu” un modelo para estudiar el cobre divalente en biología: I. Síntesis en fase sólida del segmento peptídico y formación del complejo. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx. **39**: 45-53.

RESUMEN: Se reporta la síntesis del segmento peptídico 6-18 de la proteína p21 del oncogene v-Ki-ras (Lis-Leu-Val-Val-Gli-Ala-Ser-Gli-Val-Gli-Lis-Cis-Ser¹⁸) por el método de Merrifield, modificado por Muñoz.¹ Este segmento contiene la substitución en posición 12 Gli/Ser del que depende su poder transformante. Unimos el N α Boc(O-Bzl)Ser a la resina clorometilada por esterificación para formar una unión tipo éster benílico. La desprotección de los grupos α -amino se hizo con ácido trifluoroacético (ATF) al 50% en diclorometano (DCM), la neutralización con trietilamina (TEA) al 5% en DCM, y los acoplamientos con dicitohexilcarbodiimida (DCC). Se repitieron 12 ciclos de desprotección, neutralización y acoplamiento. Se separó el péptido de la resina con HF

líquido y se purificó en HPLC de fase reversa. El péptido se hizo reaccionar con $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a diferentes pH en soluciones de etilenglicol-agua (1:1, v/v), en relaciones molares 1:1 Cu-péptido y a concentraciones finales de 4.0×10^{-3} M, para formar el complejo con Cu.

INTRODUCCIÓN

Dos temas, ambos descubiertos en la última década, parecen tener una importancia crucial en la biología molecular del cáncer y los tumores malignos. El descubrimiento de los oncogenes y las alteraciones por metales, especialmente del cobre, que se encuentra consistentemente elevado en tejidos normales y patológicos de pacientes con cáncer y en diferentes tipos de neoplasias malignas².

A la fecha no existen estudios que intenten encontrar posibles conexiones entre los oncogenes y el cobre, razones por las que decidimos sintetizar un modelo para estudiar las posibles relaciones entre los oncogenes ras y el cobre.

El oncogene v-Ki-ras fue el primero aislado de células provenientes de un carcinoma de vejiga humana.³ Es uno de los oncogenes más ubicuos en todo tipo de tumores malignos, se encuentra en cuatro de cada 10 cánceres en general y en siete de cada 10 neoplasias malignas del tubo digestivo.⁴ Recientemente, ha sido encontrado en prácticamente 100% de los cánceres de páncreas.⁵ El oncogene v-Ki-ras se ha logrado identificar en todo tipo de neoplasias del epitelio del colon, lo que permite su aislamiento e identificación en las heces de pacientes con tumores de colon y recto.⁶

La familia de oncogenes ras, constituida por H-ras, N-ras y Ki-ras, codifica para una proteína de 21 Kd denominada p21, en la que una mutación puntual en el codón 12, origina una sustitución del aminoácido Gln por Ser, dando lugar a cambios conformacionales en la proteína, determinando así su capacidad de transformar el fenotipo de diferentes tipos de células transfectadas.⁷

El segmento peptídico 6-18 de la p21Ki-ras con Ser en el residuo 12, parece ser determinante en su capacidad transformante, lo cual fue demostrado por Feramisco *et al.* quien utilizó anticuerpos específicos contra este péptido y logró la desmalignización de células previamente malignizadas con el oncogene v-Ki-ras.⁸

Recientemente, se ha demostrado que pequeños péptidos y sus complejos de Cu son importantes en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular. El factor alfa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (hormona que permite la diferenciación sexual de este eucariote) ha sido copurificado con Cu en cantidades equimolares.⁹

El tripéptido (glicil-histidil-lisina), aislado originalmente del plasma humano normal, en el que se encuentra asociado con la albúmina con niveles de 20-200 ng/ml, es copurificado en cantidades equimolares con Cu,^{9,10} ha mostrado ser capaz de estimular el crecimiento y la diferenciación de varios tipos de células somáticas humanas, tales como hepatocitos,¹⁰ fibroblastos y aun de células inmunocompetentes como linfocitos,¹¹ mantiene la viabilidad de macrófagos¹² y eosinófilos.¹³ A concentraciones de 15 a 100 ng/ml; inhibe el crecimiento de células gliales¹⁴ y provoca el crecimiento y diferenciación de neuronas embrionales.¹⁵ Este corto péptido ha sido al parecer muy conservado durante la evolución como lo atestigua el hecho de que estimula el crecimiento y la diferenciación de organismos tan distintos como micoplasmas de la cepa T,¹⁵ protozoarios y hasta la diferenciación de las larvas del nematelminto *Ascaris lumbricoides*.¹⁶

A mayores concentraciones (20 mg/ml), el tripéptido mantiene la viabilidad de los mas-

tocitos,¹⁷ inhibe el crecimiento de fibroblastos L-929¹⁸ y estimula el crecimiento de células de hepatoma en cultivo, aunque este efecto es dependiente de la presencia de suero en el cultivo.⁹ Esta diversidad de efectos, al parecer dependiente del tipo celular, concentración del péptido y condiciones de cultivo, sugieren la participación de este corto péptido como un metabolito primordial muy conservado en la evolución (tabla 1).

TABLA 1. Efectos biológicos de tripéptido "Gli-His-Lis" sobre diferentes organismos y tipos celulares

Célula u organismo	Efecto	Concentración	Suero en el medio	Ref.
Micoplasma cepa T	Estimula el crecimiento	17 ng/ml	10%	15
Larva de <i>Ascaris lumbricoides</i>	Mantiene crecimiento	14 ng/ml	4%	16
Mastocito	Mantiene viabilidad	20 g/m	20%	17
Eosinófilo	Mantiene viabilidad	20 ng/ml	Reduc. requ del 20% al 1%	13
Macrófago	Mantiene viabilidad	20 ng/ml	Reduc. requ del 20% al 1%	12
Linfocito	Transformación	30 ng/ml	Reemplaza el 10%	11
Hepatocito normal	Mantiene viabilidad	20-200 ng/ml	1%	10
Células de hepatoma	Aumenta el crecimiento	20-200 ng/ml	1%	9
Fibroblasto	Inhibe el crecimiento	500 ng/ml	no	18
Célula Glial	Inhibe el crecimiento	100-400 ng/ml	1%	14
Neurona	Estimula el crecimiento y la diferenciación	100-400 ng/ml	1%	15

La acción quelante del Gli-His-Lis, que se copurifica en concentraciones equimolares con Cu y undecimolares con fierro, explica el hecho de que al ponerse este péptido en solución, a concentración de 1 mM, frente a soluciones 0.5 mM de sulfato de Cu o sulfato ferroso, previene la formación de precipitados coloidales a pH fisiológicos de 7.4.¹⁰

La posibilidad de que este corto péptido constituya uno de los factores de crecimiento más primitivos en la evolución y que sea posiblemente el primer ejemplo de secreción autócrina (la cual constituye una de las primeras características indispensables a células con capacidad metastatizante), le da especial interés en investigación oncológica, ya que la producción de péptidos por las células cancerosas ha sido plenamente demostrada; así como la presencia de proteasas que no se encuentran presentes en condiciones normales y que permitirían la formación de una gran variedad de péptidos, de los cuales muchos podrían formar complejos con Cu y comportarse como estimuladores del crecimiento.¹⁹

– Se desconoce a la fecha, cuales son las concentraciones de este tripéptido en los pacientes con cáncer y enfermedades neoplásicas malignas, ya que podría pensarse en él, como un agente terapéutico en potencia para quelar algún tipo de Cu.

Más recientemente, complejos de este tripéptido con cobre han mostrado actividad superóxido dismutasa, y se ha demostrado su capacidad antitraumática, actividad protectora tisular contra radicales libres y efectos angiogénicos y neurogénicos.²⁰ Por lo que sintetizar el segmento 6-18 de la proteína p21 del oncogene v-Ki-ras y formar el complejo con cobre proporcionaría un modelo para iniciar estudios encaminados a buscar las relaciones entre los oncogenes y el cobre. Al estudiar las propiedades ópticas del complejo formado, encontramos que sus características en la región visible son semejantes a las que presentan las proteínas azules, que intervienen en procesos de transporte de carga y de óxido reducción.²¹

Síntesis del segmento 6-18 de la proteína p21v-Ki-ras

El péptido 6-18 que contiene la sustitución en el residuo 12, fue sintetizado por el método de Merrifield en fase sólida y en forma manual, con protocolo de doble acoplamiento para cada Boc-aminoácido.^{1,22} El primer aminoácido correspondiente al extremo carboxilo terminal de la secuencia, fue anclado a la resina por medio de las sales de cesio del N α Boc(O-Bzl)Serina el que se unió covalentemente por esterificación a un soporte de estireno y divinilbenceno (resina clorometilada) por medio de un enlace tipo éster bencílico. El siguiente aminoácido, con su grupo α -amino protegido, se acopló y activó con DCC para reaccionar con la aminoacil resina y formar una dipeptidil-resina. El exceso de reactivos y subproductos fueron eliminados por lavados y filtrados. Los grupos α -amino protegidos fueron eliminados con ácido trifluoroacético al 50% en DCM y posteriormente neutralizados con trietilamina al 5% en DCM para unir a la cadena el siguiente Boc-aminoácido.

Los pasos de desprotección, neutralización y acoplamiento, que constituyen un ciclo sintético, se repitieron durante doce ocasiones para obtener la cadena deseada. Los péptidos fueron separados de la resina con HF anhidro y 1% de anisol para evitar reacciones indeseables en las cadenas laterales de los aminoácidos durante la desprotección acidolítica.²³ Una vez liberados, los péptidos fueron purificados en columna semipreparativa de fase invertida CH-10, separando así la secuencia deseada de los péptidos incompletos contaminantes. La identificación y evaluación de la separación, se hizo con una columna analítica de fase reversa μ -Bondapack C18 con metanol-agua (1:1) como fase móvil y en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian 5020.

Formación del complejo

Se formó el complejo con el péptido en solución y Cu(ClO₄)₂·6H₂O en relación molar 1:1, a una concentración final de 4×10^{-3} M. Sobre la solución se varió el intervalo de pH de 5.6 a 11.6 con una solución de NaOH 0.1 M. En cada uno de los cambios de pH's se midió la absorbancia y el coeficiente de extinción de las soluciones en la región UV/Vis.

Reactivos y disolventes utilizados

Los aminoácidos Gli, L-Val, NBoc-Ala, NBoc-Leu, la resina clorometilada y la DCC fueron obtenidos de Laboratorios Sigma Chemical Company (USA). El N α -Boc(S-Bzl)Cis, N α -Boc(Z)His N α -Boc(O-Bzl)Ser y el N α -Boc(O-Bzl)Tir de Laboratorios Península (USA) Inc. La DMF, TEA, TFA, Boc-On, CO₂CS₂ de Aldrich Chemical Company, Inc., (USA). El ácido cítrico, éter etílico, isopropanol, metanol y n-butanol de J. T. Baker (México). El acetato de etilo y cloruro de metileno de ADIASA (México). El ácido pícrico de Laboratorios Merck (México). El dioxano y el ácido acético de Laboratorios Monterrey (México). Se destiló con carbonato de calcio al cloruro de metileno, isopropanol y acetato de etilo. La DMF se bidestiló a presión reducida con ninhidrina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La selección del fragmento peptídico fue hecha fundamentalmente con base en resultados obtenidos por Feramisco *et al.*⁷ La figura 1 muestra un cromatograma obtenido con el péptido crudo, del que aislamos el pico principal con un tiempo de retención de 48 min., el que posteriormente fue corrido en un gradiente isocrático, mostrando un solo pico, como puede apreciarse en la figura 2.

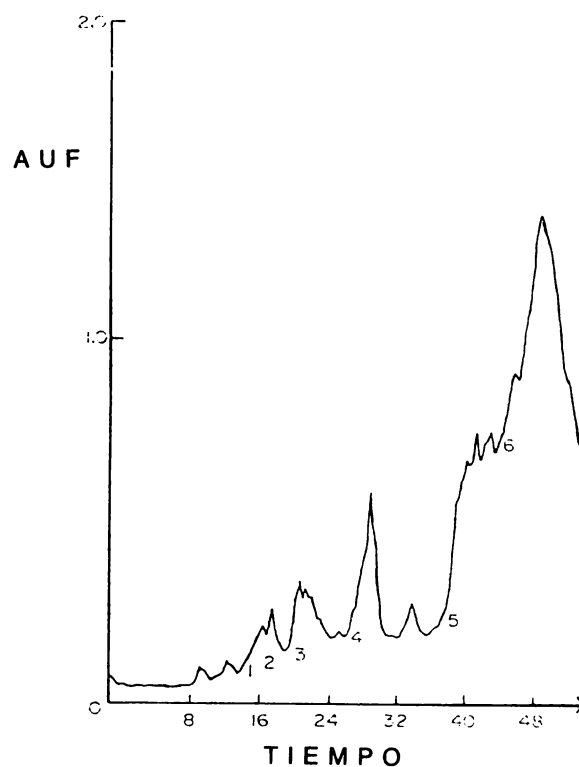


FIG. 1. Cromatograma preparativo del péptido crudo "6-18 ki-ras". Columna semipreparativa MCH 10. Fase móvil metanol agua, gradiente por pasos, flujo de 3 ml/min. Detección a 230 nm.

El complejo "6-18 Ki-ras-Cu" en solución, al variar el pH, mostró cambios de coloración que revelaron la formación del complejo y los posibles ligandos del ion cobre. A pH 5.6 la solución mostró un color azul claro, semejante al que se menciona para proteínas azules. Al cambiar el pH a 7, se tornó en azul lechoso, es decir una solución más densa, conservándose estas características aun a pH 8. En intervalos más altos de pH, entre 9 y 11.6, el color viró a violeta, semejante al obtenido durante la reacción de Biuret. Las variaciones de color producidas por el cambio de pH fueron reversibles y los complejos formados estables por varias horas.

Las variaciones de color en la solución del complejo, producidas por el cambio de pH, fueron observadas por espectroscopía óptica (en un espectrofotómetro Beckman DU-6). Los espectros mostraron dos bandas principales de absorción, una señal muy marcada en la región visible aproximadamente a 600 nm (figura 3); y otra en la región ultravioleta a 360 nm (tabla 2), ambas señales, semejantes a las de las proteínas azules y atribuidas a transiciones de transferencia de carga.

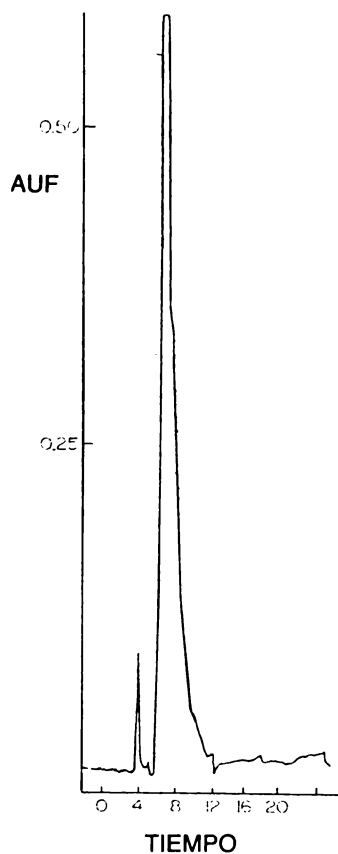


FIG. 2. Cromatograma analítico del pico principal aislado del péptido crudo. Columna analítica μ -Bondapak C18, fase móvil metanol-agua 1:1 v/v, flujo de 1.5 ml/min, detección a 230 nm.

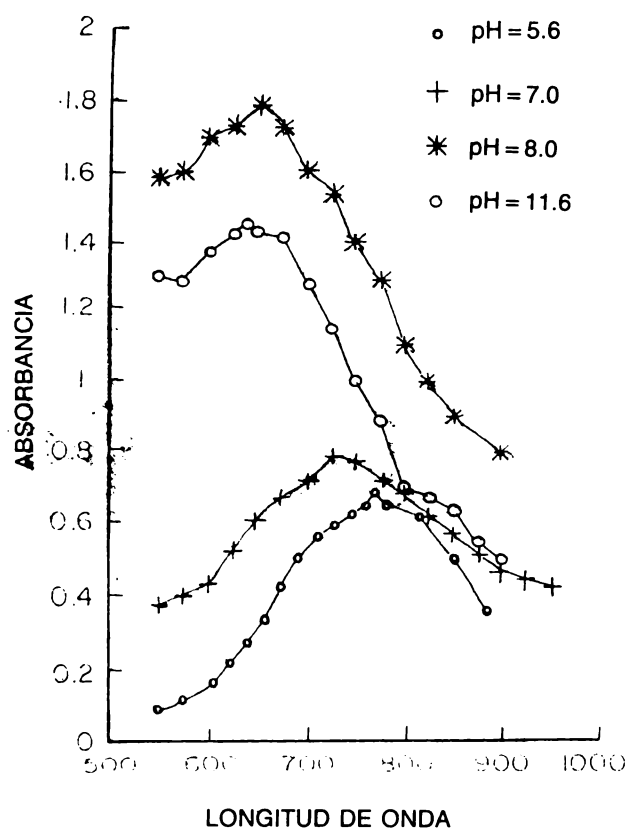


FIG. 3. Espectro del complejo "6-18 ki-ras-Cu" en la región visible, mostrando el efecto batocrómico y el incremento en la absorbancia al variar el pH en la solución.

TABLA 2. Valores del complejo "6-18 Ki-ras-Cu" en la región UV, en donde no se encuentra un cambio significativo al variar el pH.

λ	ABS	pH
350	0.2	5.5
365	0.3	7.0
370	0.5	8.0
360	0.5	11.5

Con el cambio de pH, las señales en la región visible sufren un desplazamiento (efecto batocrómico), mientras que en la región ultravioleta no cambian. El desplazamiento en la región visible está asociado probablemente con un cambio de ligandos en el complejo. Sin embargo, el azufre es el ligando preferencial para el cobre, como lo demuestra la fuerte banda de absorción que se conserva al variar el pH, además de que su posición e intensidad sólo se observan en complejos que contienen azufre como ligando.²⁵ Por lo que pensamos que los complejos formados al variar el pH, deben contener por lo menos un átomo de azufre como ligando.

Estos datos, que nuestros experimentos aportan con el complejo, de cambio de coloración, de desplazamiento en el visible, así como la fuerte banda de absorción que presentan, son muy importantes en los sistemas biológicos, ya que podrían indicar un cambio de conformación del péptido y por lo tanto una variación de los ligandos del ion cobre, así como de procesos de óxido-reducción y de transferencia de carga. Tales cambios y procesos podrían relacionarse con modificación de funciones en la proteína p21, que podrían estar relacionados con la transformación maligna.

El comportamiento del complejo peptídico en el visible podría sugerir que una de las funciones de la p21Ki-ras sería la de transferencia de electrones (por la fuerte banda de absorción) y por lo tanto presentar actividad enzimática de óxido-reducción, semejante al de las proteínas azules.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda de: Dr. L. Posanni y Dr. J. Martín Polo, M.C. Georgina Gurrola y M.C. Luis Vaca, del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, las facilidades para separar el péptido de la resina. Al profesor Filiberto Vázquez D. del Depto. de Química Orgánica de la ENCB, del IPN su valiosa colaboración y sugerencias en la formación del complejo con Cu. Al profesor Miguel Lázaro G. del mismo Departamento por la separación en HPLC.

SUMMARY

In this paper we report the synthesis by the Merrifield's solid phase method, modified by Muñoz, of the 6-18 peptidic segment of the p21 protein codified by the v-Ki-ras oncogen. This segment (Lis-Leu-Val-Gli-Ala-Ser-Gli-Val-Gli-Lis-Cis-Ser¹⁸) contains the 12 Gli/Ser substitution, which constitutes one of the more frequent mutations that endowed the pro-

tein with transforming capacity. The synthesis started by the union of the N α -Boc(O-Bz)Ser to the chloromethylated resin by esterification in order to make a benzylic ester bond. The deprotection of the α -amino groups was made with 50% of trifluoroacetic acid in DCM. The neutralization was made with 5% of triethylamine in DCM, and the different couplings with dicyclohexylcarbodiimide. The cycle of deprotection, neutralization and couplings was repeated twelve times. And the peptide from the resin using liquid HF was separated. The purification of the peptidic segment was made in reverse phase HPLC. In order to make the "6-18 Ki-ras-Cu" complex, the peptide was treated with Cu(CLO₄) \cdot 6H₂O at different pHs in ethyleneglycol-water solution (1:1, v/v), this is a 1:1 molar ratio Cu-peptide to a final concentration of 4.0×10^{-3} M. The "6-18 Ki-ras-Cu" complex behavior at different pHs, and some of its principal characteristics observed at the Vis and UV spectra were discussed. The complex showed similar properties to the blue copper oxidases.

REFERENCIAS

1. Juárez-Gordiano, C.; Quiroz-Gutiérrez, A., Fundamentos de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida por la Técnica Modificada por Héber Muñoz (en este volumen).
2. Quiroz-Gutiérrez, A., *Infor-Sybtex*, 1989, **15**: 4; *Ibid.*, 1989, **15**: 2; Quiroz-Gutiérrez, A.; Juárez-Gordiano, C.; Hernández, P.T.; González, I., *Rev. Mex. Fis.*, 1992, **38**: Supl. 1, 152.
3. Barbacid, M., *Ann. Rev. Biochem.*, 1987, **56**: 779. Kumar, R.; Sukumar, S.; Barbacid, M., *Science*, 1990, **248**: 1101.
4. Bos, J.L.; Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; de Vries, V.M.; Vogelstein, B., *Nature*, 1987, **327**: 293.; Forrester, K.; Almoguera, C.; Han, K.; Grizzle, W.E.; Perucho, M. *Nature* 1987: **327**: 298.
5. Bos, J.L., *Cancer Res.*, 1989, **49**: 4682.
6. Sidransky, D.; Tokino, T.; Hamilton, S.R.; Kinzler, K.W.; Levin, B.; Frost, P.; Vogelstein, B., *Science*, 1992, **256**: 102.
7. MacGrath, J.P.; Capon, D.J.; Goeddel, D.V.; Levinson, A.D., *Nature*, 1984, **310**: 644.; Marshall, C.J., *Trends in Genetics*, 1991, **7**: 91.
8. Feramisco, J.R.; Clark, R.; Wong, G.; Arnheim, N.; Milleř R.; McCormick, F., *Nature*, 1985, **314**: 639.
9. Pichart, L., en *Chemistry and Biochemistry of Aminoacids Peptides and Proteins*; Weinstein B., Ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 1982.
10. Pickart, L.; Thaler, M.M., *Nature New Biol.*, 1973, **243**: 85.; Schlesinger, D.H.; Pickart, L.; Thaler M.M., *Experientia*, 1977, **33**: 324.
11. Pickart, L.; Thayer, L.; Thaler, M.M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1973, **54**: 562.
12. Dessaint, J.P.; Camus, D.; Fischer, E.; Capron, A., *Eur. J. Immunol.*, 1977, **7**: 624.
13. Joseph, M.; Dessaint, J.P.; Capron, A., *Cell. Immunol.*, 1977, **34**: 247.
14. Capron, M.; Capron, A.; Torpier, G.; Bazin, H.; Bout, D.; Joseph, M., *Eur. J. Immunol.*, 1978, **8**: 127.
15. Sensenbrenner, H.; Jaros, G.G.; Moonen, G.; Mandel P., *Neurobiology*, 1975, **5**: 207.
16. Robertson, J., *J. Clin. Microbiol.*, 1977, **7**: 127.
17. Slotta, K.; Golub, A.L.; López, V., *Physiol. Chem.*, 1975, **356**: 367.
18. Pickart, L.; Thaler, M., *J. Chromatogr.*, 1979, **175**: 65.
19. Sporn, M.B.; Anzano, M.A.; Assoian, R.K.; De Larco, J.E.; Frolik, C.A.; Meyer, C.A.; Roberts, A.B., *Cancer Cells. 1. The Transformed Phenotype*, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1984.
20. Pickart, L.; Jovejoy, S., *Methods in Enzymol.*, 1987, **147**: 314.; Juárez-Gordiano, C.; Her-

- nández, P.T.; González I.; Quiroz-Gutiérrez, A., *Rev. Mex. Fs.*, 1992, **38**: 160.
21. Malmstrom, B.G.; Vangard, T., *J. Mol. Biol.*, 1980, **2**: 118.
 22. Merrifield, R.B., *Science*, 1965, **150**: 178.
 23. Sakakibara, S.; Shimonishi, Y., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1965, **38**: 1412.
 24. Malmstrom, B.G., in: *New Trends in Bio-Inorganic Chemistry*; Williams, R.J.P.; Da Silva J.R.F., Eds.; Academic Press: New York, 1978.
 25. Amundsen, A.R.; Whelan, J.; Bosnich, B.J., *J. Am. Chem. Soc.* 1977, **99**: 6730.

Recibido en enero de 1992. Aceptado para su publicación en julio de 1993.