

Estructura tridimensional de un fragmento de 3 Kda del factor derivado de Plaquetas-4 con actividad antiangiogénica e interacción con el factor de crecimiento para fibroblastos

ROSA M. LOZANO, MARIANO REDONDO-HORCAJO,
GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO
Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C),

RESUMEN

El factor derivado de plaquetas-4 es una proteína perteneciente a la familia de las «quemoquinas CXC, carentes de la secuencia ELR». Esta proteína se une al factor de crecimiento para fibroblastos inhibiendo su actividad mitogénica. Así mismo se ha demostrado que inhibe el crecimiento tumoral a través de un mecanismo antiangiogénico en el que debe jugar un papel importante el bloqueo de la actividad del factor de crecimiento para fibroblastos. El factor derivado de plaquetas-4 posee una estructura tridimensional complicada, por lo que es poco probable que puedan obtenerse cantidades industriales del producto, con calidad farmacológica, tanto por síntesis química como mediante ingeniería genética. Se ha demostrado que un fragmento equivalente a los veinticuatro residuos últimos del extremo carboxilo terminal de la proteína completa posee también actividad antiangiogénica *in vitro* e *in vivo*, forma un complejo con estequiometría 1:1 con el factor de crecimiento para fibroblastos y hace que disminuya su afinidad por su receptor de alta afinidad de la superficie celular. Este fragmento posee numerosas características para constituir un buen sustituto terapéutico de la proteína completa. La estructura tridimensional en solución de este fragmento es relativamente sencilla y notablemente estable. Consta de dos subdominios helicoidales que parece que es necesario que se mantengan unidos, tanto para la inhibición y la formación del complejo, como para que uno de los subdominios siga siendo helicoidal. La caracterización estructural a alta resolución de este fragmento puede contribuir a entender las bases estructurales de su actividad antiangiogénica y, por tanto, podría permitir mejorar sus propiedades farmacológicas. A su vez puede ayudar a una mejor comprensión de las bases estructurales de la fisiología del factor derivado de plaquetas-4.

Palabras clave: Factor plaquetario-4 (PF4).—Factor de crecimiento para fibroblastos (FGF).—Antiangiogenesis.—Tratamiento antitumoral.—CXC-quemoquina.

Three-Dimensional structure and interaction with fibroblast growth factors of A 3-Kda human Platelet Factor-4 fragment with antiangiogenic activity

SUMMARY

Platelet-factor-4 is a protein belonging to the family of ELR negative CXC chemokines which binds to fibroblast growth factor, and inhibits its mitogenic activity. Platelet-factor-4 also inhibits tumor growth by mechanisms involving antiangiogenesis in which the blockage of fibroblast growth factor mitogenic activity seems to play an essential role. Synthesis of platelet-factor-4 by recombinant technologies is a considerably cumbersome process that does not seem could sustain an industrial production of pharmacological-quality because of platelet-factor-4 quaternary structure, and because the protein activation requires an intramonomer hydrolysis. It has been shown that the protein's twenty-four residue C-terminal fragment is also antiangiogenic *in vitro* and *in vivo*, forms a specific 1:1 complex with fibroblast growth factors and decreases their affinity for their cell surface receptor. Thus this fragments seems could constitute an alternative to the use of the whole platelet factor-4 for several of its therapeutic applications. The fragment's preferential three-dimensional conformation in solution is quite stable and has been found to be composed of two helical sub-domains, which, both, seem required for inhibition of fibroblast growth factor driven mitogenesis. The characterization, at high resolution, of the three-dimensional structure of this fragment may contribute to the understanding of the basis of its antiangiogenic activity, and, thus, contribute to the optimization of their pharmacological properties. At the same time this structural characterization may also contribute to a deeper perception of the platelet factor-4 physiology.

Key words: Platelet factor-4 (PF4).—Fibroblast growth factor (FGF).—Antiangiogenesis.—Antitumoral therapies.—CXC-chemokines.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis juega un papel muy importante en muchas patologías como en el cáncer y en determinadas enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. La angiogénesis está regulada por una serie de proteínas que bien pertenecen a la familia de los factores de crecimiento para fibroblastos o a la de los factores de crecimiento del endotelio vascular (1, 2). La familia de los factores de crecimiento para fibroblastos incluye en este momento 22 proteínas estrecha-

mente relacionadas. Dos de ellas las denominadas factor de crecimiento para fibroblastos ácido (aFGF) y factor de crecimiento para fibroblastos básico (bFGF) fueron las primeras en ser caracterizadas, y sus propiedades se consideran prototipo de las de toda la familia (3-5). Hasta ahora no se han observado diferencias claras en el espectro de actividades de estas proteínas. A diferencia del bFGF, numerosos experimentos biológicos ponen de manifiesto que el aFGF necesita frecuentemente estar estabilizado por heparina. No obstante, unas ligeras modificaciones de la proteína la liberan de este requerimiento (6). Los factores de crecimiento para fibroblastos se unen a dos clases de receptores de la superficie celular: unos de baja afinidad (los heparán sulfato de las cubiertas celulares) (7) y otros de alta afinidad constituidos por proteínas transmembranales con actividad tirosín-quinasa (8). El segundo tipo de receptor, una vez unido al factor de crecimiento para fibroblastos, transmite al interior celular la señal de comenzar el proceso de mitosis. El receptor de baja afinidad, que puede ser sustituido sencillamente por heparina, aunque no es imprescindible, aumenta la eficiencia de todo el proceso de señalización (9,10). Se ha demostrado que la angiogénesis promovida por los factores de crecimiento del endotelio vascular depende de la síntesis de bFGF por las propias células endoteliales y resulta bloqueada consecuentemente por anticuerpos contra el bFGF (11, 12). A la hora de desarrollar fármacos que inhiban la angiogénesis, los factores de crecimiento para fibroblastos constituyen, por tanto, un blanco de interés especial.

El factor derivado de plaquetas-4 (PF4) es una quemoquina del grupo de las «quemoquinas CXC, carentes de la secuencia ELR» que posee alta afinidad por los glicosaminoglicanos sulfatados tales como la heparina o el heparán sulfato. El PF4 inhibe la proliferación de las células endoteliales, su migración, y la formación de nuevos vasos sanguíneos tanto *in vitro* como *in vivo* (13-15). Como consecuencia de ello, el PF4 es capaz de inhibir la proliferación tumoral a través de un mecanismo antiangiogénico (16-19). El PF4 ha resultado ser justamente el inhibidor plaquetario de la actividad mitogénica del bFGF (20). Es más, se ha demostrado que el PF4 se une al bFGF e inhibe procesos considerados esenciales para la inducción de la mitogénesis por esta proteína (unión del bFGF a los receptores de alta afinidad; internalización del bFGF; activación del bFGF por los

heparán sulfato de las cubiertas celulares) (21, 22). El interés farmacológico del PF4 resulta, por tanto, obvio. Sin embargo, descartada su obtención de fuentes naturales por razones evidentes, su preparación mediante técnicas de ingeniería genética o síntesis química, con los medios actualmente disponibles, no permitirá disponer de cantidades industriales de PF4 de calidad farmacológica, debido a que se trata de una proteína con estructura cuaternaria, con puentes disulfuro intracatenales no glicosilada y activada finalmente a través de una hidrólisis selectiva. Sin embargo se ha descrito recientemente que un fragmento del PF4 (PF4⁴⁷⁻⁷⁰) que incluye los aminoácidos 47 al 70 del monómero (los 24 residuos del extremo carboxilo terminal) emula la actividad antiangiogénica de la proteína completa tanto *in vitro* como *in vivo* (23, 24), lo que podría ofrecer una vía para obviar las dificultades que presenta la síntesis de la proteína completa a la hora de pensar en su uso para desarrollar nuevos tratamientos antiangiogénicos. Como en el caso del PF4 completo, el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ impide la unión del bFGF a su receptor y se ha demostrado que inhibe también la proliferación celular inducida tanto por el aFGF como el bFGF (FGFs) en ausencia de heparina y heparán sulfato (6, 21, 24). La observación de que el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ sigue inhibiendo la actividad mitogénica de los FGFs en ausencia de heparina y heparán sulfato es importante dada la alta afinidad del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ por estos glicosaminoglicanos sulfatados, pues, de lo contrario, podría suceder que la inhibición de los FGFs no fuera otra cosa que una bajada en la eficiencia del proceso de señalización que dispara la mitosis al quedar secuestrados los sitios de unión del heparán sulfato y de la heparina por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ (22, 24, 25-28). Se conoce la estructura tridimensional del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ (6). Este artículo pretende ofrecer una síntesis de las características de esta estructura, de la caracterización biofísica de la interacción de los FGFs con el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y de la correlación de estos últimos datos con la inhibición de la actividad mitogénica de los FGFs.

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL PF4⁴⁷⁻⁷⁰

La caracterización biofísica de una proteína parece que debe incluir siempre, casi como colofón, el cálculo de su estructura tridimensional. Sin embargo, esto no siempre es posible. Unas veces por

dificultades técnicas, otras porque el polipéptido sencillamente no tiene estructura tridimensional. En general, este suele ser el caso de los polipéptidos pequeños como el PF4⁴⁷⁻⁷⁰. Antes pues de embarcarse en los complicados estudios requeridos para establecer la estructura tridimensional del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, la posibilidad de que este polipéptido la tuviera fue investigada mediante aproximaciones más sencillas como los estudios de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano. En el caso de que en un paso ulterior pueda calcularse la estructura tridimensional de un polipéptido a alta resolución, los estudios de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano pueden permitir, además, seguir suficientemente de cerca determinados cambios en la estructura sin tener que acudir a calcular de nuevo la estructura completa de la forma modificada. En el caso del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, los estudios de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, resumidos en la Figura 1, pusieron de manifiesto que este polipéptido poseía, al menos, una estructura secundaria muy abundante en plegamientos en hélice. En base a la elipticidad molar a 222 nm (29) es posible estimar que el contenido en hélice del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ se aproxima al 46%. Hay que destacar, pues se trata de una característica muy notable del espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, que su espectro no se altera en un intervalo de pH muy amplio (entre 3 y 10) e igualmente en un intervalo de temperatura también muy amplio (entre 25 y 85 °C). Igualmente hay que destacar que aunque el polipéptido se haya desnaturalizado utilizando urea, condiciones en que su espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano es el típico de los polipéptidos plegados al azar, el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ recobra su plegamiento original tan pronto como se elimina el agente desnaturalizante. Igualmente hay que destacar que para que el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ quede totalmente plegado en forma de hélice basta añadir a la mezcla trifluoroetanol a una concentración final del 25%, una concentración destacadamente baja, pues los péptidos considerados de alta propensión a plegarse en forma de hélice requieren concentraciones de trifluoroetanol entre el 30 y el 50% (30). El PF4⁴⁷⁻⁷⁰ es por tanto un polipéptido con una alta tendencia a plegarse de forma muy estable en hélice.

Los datos de dicroísmo circular ponen de manifiesto que una proporción importante del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ se pliega de una forma definida cuando está en solución. Estudios biofísicos de mayor resolución,

como la resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H), permiten caracterizar con mucho más detalle esta estructura.

Los datos más concluyentes de la existencia de un plegamiento preferencial de un polipéptido en solución proviene de la existencia de conexiones NOE no secuenciales. En la Figura 2A (panel superior) aparece recogida la secuencia del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y un resumen de las conexiones NOE observadas. Aparte de las conexiones secuenciales, se observan efectivamente una serie de ellas no secuenciales que junto con otras no secuenciales que implican protones de las cadenas laterales (no recogidas en la figura) son indicación clara de plegamiento en hélice- α del PF4⁴⁷⁻⁷⁰. Además, cuando se excluyen los residuos de los extremos amino y carboxilo, las diferencias entre los desplazamientos químicos (valores δ) de los protones de los carbonos α del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, con respecto a los valores típicos que adoptan estos en el caso de un polipéptido plegado al azar, son en general negativos y relativamente grandes en valor absoluto (>0.05 ppm tanto a pH 3.4 como a pH 6.5; Figura 2 A, paneles inferiores). El valor de estas diferencias también indica que el plegamiento helicoidal predomina a lo largo de toda la secuencia del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, pues estas diferencias se hacen negativas en el caso de que los residuos estén incluidos en

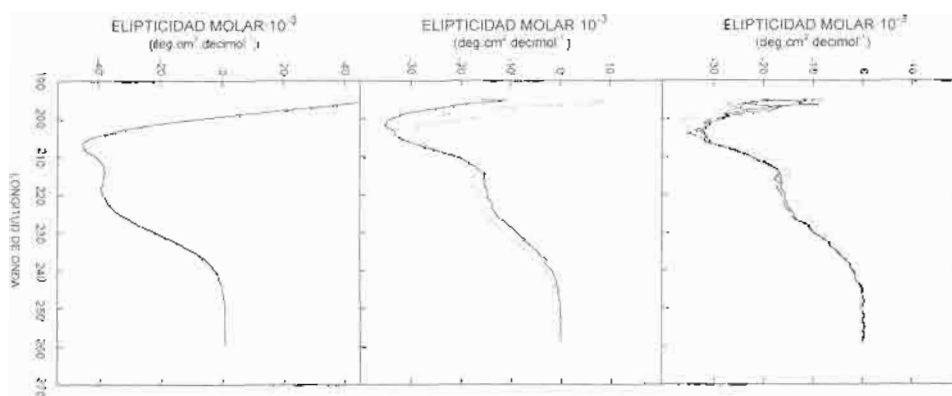


FIGURA 1. *Elipticidad molar en el UV lejano del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ en diferentes condiciones. Panel superior, espectros a pH 10 (línea de guiones), pH 7 (línea continua) y pH 3 (línea de puntos). Panel intermedio, espectro a 25 °C (línea continua) y a 85 °C (línea de puntos). Panel inferior, espectro en presencia de trifluoroetanol al 25% v/v. El PF4⁴⁷⁻⁷⁰ (72 μM) estaba disuelto en una solución de fosfato sódico 10 mM y cloruro sódico 80 mM ajustada a pH 7.2 excepto en el caso del panel superior en el que el pH estaba ajustado a los valores indicados (6).*

hélices y positivos en el caso de que lo estén en estructuras secundarias extendidas o plegadas en lámina- β (31-33). Unos resultados equivalentes se obtienen cuando los espectros de RMN- ^1H se adquieren utilizando soluciones que contienen 30% de trifluoroetanol, con las diferencias, eso sí, que cabe esperar de que en estas condiciones todo el polipéptido se haya plegado en forma de hélice, de acuerdo con los datos de dicroísmo circular. Como pone de manifiesto la Figura 2B (panel superior), el número de conexiones NOE característico de un plegamiento en hélice- α aumenta considerablemente. Además, las diferencias de los desplazamientos químicos de los protones de los carbonos α con respecto a los valores típicos de un plegamiento al azar, se hacen considerablemente más negativos, sobre todo entre los residuos 57 y 68, lo que indica que es en esta región donde especialmente se intensifica el plegamiento en hélice α tanto a pH 3.4 como a pH 6.5 cuando el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ se encuentra en presencia de trifluoroetanol (Figura 2B, paneles inferiores).

Los datos de RMN- ^1H permiten también calcular la estructura tridimensional del PF4⁴⁷⁻⁷⁰. Esta estructura aparece recogida en la Figura 3 (en el panel superior se recoge una vista estereoscópica de la superposición de los átomos pesados del esqueleto y las cadenas laterales ajustada a un valor mínimo de la raíz de la desviación cuadrática de la media y en el inferior un diagrama en cinta de la topología del esqueleto). Los esquemas de la Figura 3 realmente corresponden a las estructuras calculadas para una solución de PF4⁴⁷⁻⁷⁰ en presencia del 30% de trifluoroetanol pues sólo en estas condiciones el número de conexiones NOE no secuenciales (141 en total) era adecuado para lle-

isoleucina, alanina, prolina, tirosina) y los cargados positivamente (lisina) se agrupan en caras opuestas de la hélice. Conviene también apuntar que este tipo de hélices anfipáticas se dan con frecuencia en las regiones de las proteínas implicadas en la formación de complejos específicos.

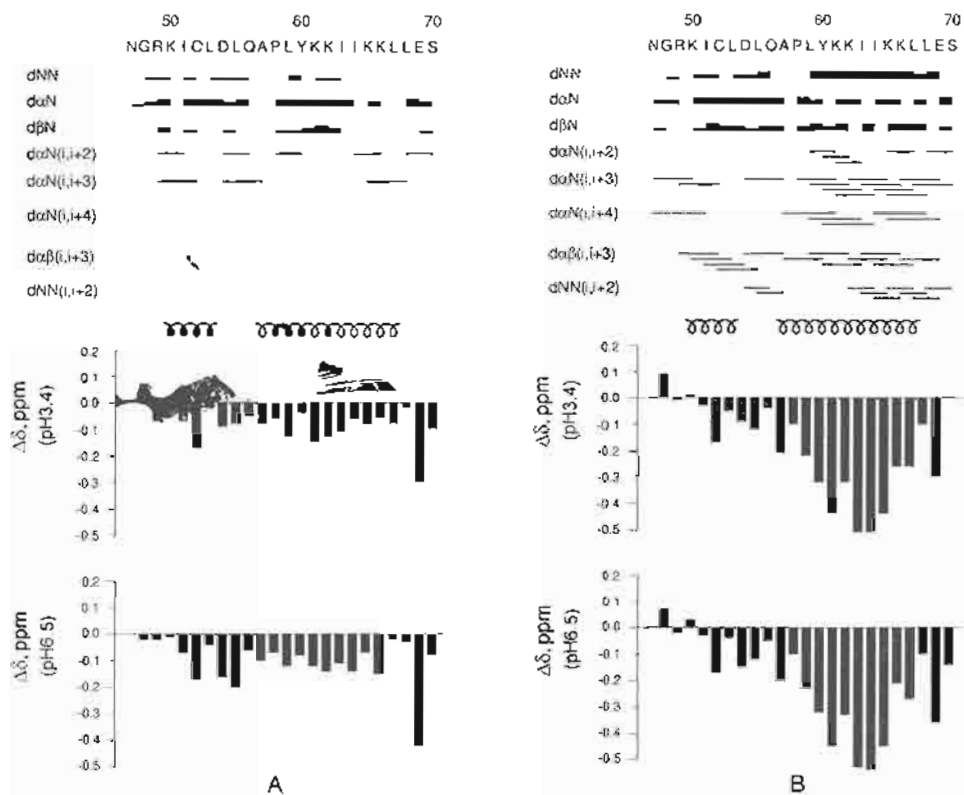


FIGURA 2. Resumen de las conexiones NOE y de los desplazamientos conformacionales de el PF4⁴⁷⁻⁷⁰. Las conexiones NOE del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ en ausencia (A) y en presencia de trifluoroetanol al 30% (B) aparecen representadas en la parte superior de la figura, y los desplazamientos conformacionales en la parte inferior en diagrama de barras. Excepto donde se indica expresamente, los datos proceden de experimentos llevados a cabo a pH 3.4. $Dd_{i,j}$ es la diferencia en partes por millón entre los desplazamientos químicos observados en el caso de un residuo concreto y el que sería de esperar si este residuo estuviera en una zona de la proteína sin estructura (42). El grosor de la línea refleja la intensidad de la conexión NOE (débil, media y fuerte). Las regiones plegadas en hélice- α a lo largo de la secuencia del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ aparecen esquematizadas justo encima de los histogramas. Para representar la secuencia de aminoácidos del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ se ha utilizado el código convencional de una letra (6).

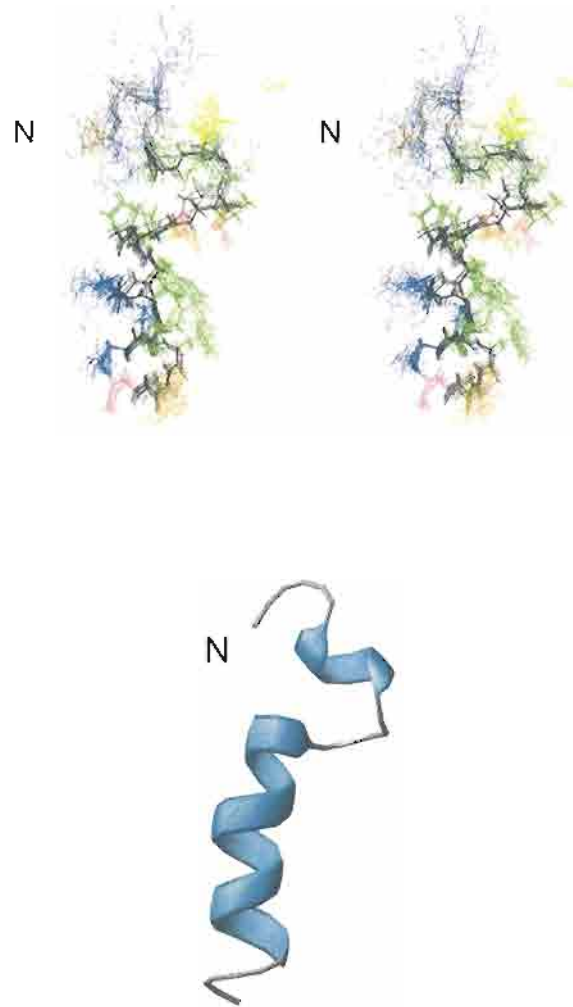


FIGURA 3. Estructura tridimensional del $PF4^{47-70}$. Panel superior, vista estereoscópica de la superposición de las 20 estructuras que mejor se ajustan a las restricciones de distancia utilizadas para el cálculo (esqueleto: negro; cadenas laterales: amarillo, cisteína; azul, cargadas positivamente; rojo, cargadas negativamente; naranja, hidrofílicas; verde, hidrofóbicas). En la figura se aprecia claramente la distribución de las cadenas laterales hidrofóbicas y cargadas positivamente en caras opuestas de la hélice carboxilo terminal del $PF4^{47-70}$. Panel inferior, representación en cinta de la topología del esqueleto del $PF4^{47-70}$. Las estructuras representadas corresponden a soluciones de $PF4^{47-70}$ en presencia de un 30% de trifluoroetanol (6).

El cálculo de la estructura del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ se llevó a cabo también utilizando el mismo conjunto de restricciones de distancia al que se añadieron las nueve conexiones NOE no secuenciales observadas en los espectros obtenidos con las soluciones del polipéptido carentes de trifluoroetanol y que no están presentes cuando los espectros se obtienen de soluciones que contienen este último compuesto. Puesto que no se observaron diferencias entre las estructuras calculadas a partir de este segundo conjunto de datos y del primero, parece obvio concluir que el plegamiento del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ en solución no debe ser substancialmente diferente en modo alguno del que adopta cuando a la solución se añade además trifluoroetanol. Debe, no obstante señalarse, que en el caso de los polipéptidos el cálculo de un limitado número de estructuras compatibles con un conjunto de restricciones NOE no debe interpretarse como que el polipéptido adopta una conformación única en solución, pues de hecho se da un alto grado de promediado conformacional en estas soluciones (34), sino como el conjunto de conformaciones que este adopta preferencialmente en solución. La determinación de la estructura tridimensional del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ unido a los FGFs permitirá tal vez determinar la importancia que estos plegamientos preferenciales pueden tener a la hora de esta unión y de la inhibición de la actividad mitogénica de estos factores de crecimiento.

A la vista de la topología de la estructura del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, cabe preguntarse si los dos elementos de estructura secundaria podrían adoptar este plegamiento por sí mismos o si, por el contrario, existía algún efecto cooperativo global, probablemente reflejado en la pequeña estructura terciaria detectable en el plegamiento del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, que fuera responsable de la aparición de estos dos elementos de estructura secundaria. La síntesis y los estudios de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de dos polipéptidos correspondientes a las regiones del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ que corresponden aproximadamente a los dos subdominios helicoidales (PF4⁵⁴⁻⁷⁰ y PF4⁴⁷⁻⁵⁸, respectivamente) pusieron claramente de manifiesto que en el caso de la hélice menor (residuos 50 a 53) el carácter helicoidal no se adoptaba en base solo a la información intrínseca de su secuencia, mientras que en el caso de la hélice mayor (residuos 57 a 67) el propio polipéptido poseía ya una tendencia considerable a adoptar una conformación helicoidal del orden del que poseía en el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ completo. De acuerdo con

estos datos parece obvio que debe postularse la existencia de efectos cooperativos derivados de la estructura primaria total del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ para dar cuenta de su pequeña estructura terciaria y de la formación de la hélice menor. Los polipéptidos PF4⁵⁴⁻⁷⁰ y PF4⁴⁷⁻⁵⁸ carecen también de capacidad de inhibir la actividad mitogénica del bFGF tanto por separado como cuando están presentes ambos (Figura 4). De acuerdo con estos resultados es necesaria la información contenida en la secuencia completa del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, ya sea directa o indirectamente, para inhibir la actividad mitogénica de los FGFs.

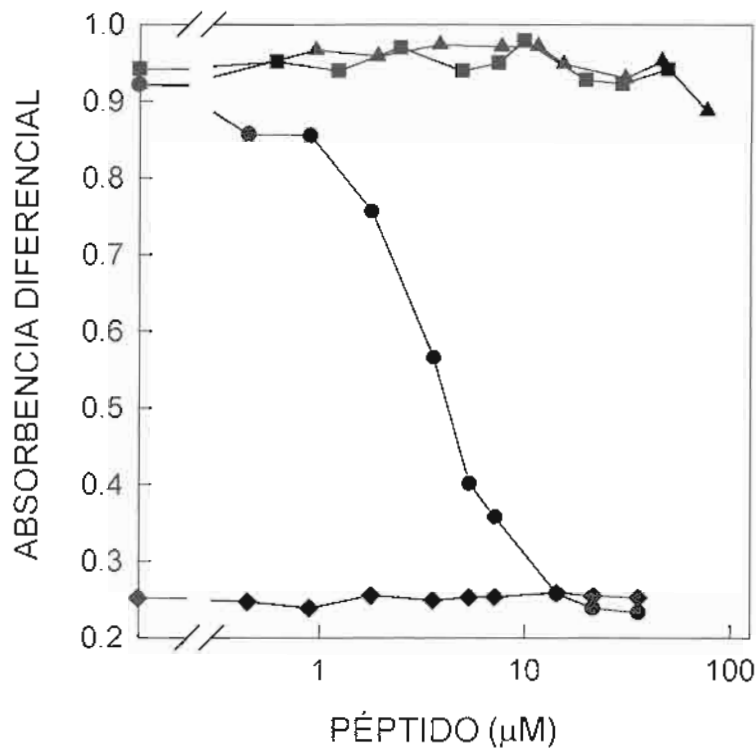


FIGURA 4. Efecto del PF4⁴⁷⁻⁷⁰, PF4⁴⁷⁻⁵⁸ y PF4⁵⁴⁻⁷⁰ sobre la actividad mitogénica del bFGF. Las células (BaF3/FR1c-11) fueron tratadas con concentraciones crecientes PF4⁴⁷⁻⁷⁰ (●, ◆), PF4⁴⁷⁻⁵⁸ (▲) o PF4⁵⁴⁻⁷⁰ (■). En todos los casos excepto en (◆), las células fueron inducidas a dividirse por una concentración de mitógeno (60 ng/ml) que produce un aumento de células de aproximadamente el 85% del que puede conseguirse a concentraciones saturantes del mitógeno (dos duplicaciones consecutivas de la población en 48 horas). Las células se incuban simultáneamente en presencia del mitógeno y los péptidos durante 48 horas (6).

INTERACCIÓN DEL PF4⁴⁷⁻⁷⁰ CON EL bFGF

Tanto el aFGF como el bFGF poseen un único residuo de triptófano que apenas fluoresce cuando se le excita a 295 nm. Los cambios en la fluorescencia de este residuo se han utilizado frecuentemente para detectar cambios en la estructura de los FGFs (35, 36) que frecuentemente se asume que corren paralelos a su inactivación. Los estudios de fluorescencia, sin embargo, aunque ponen de manifiesto que el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ interacciona con el bFGF también dejaban claro que los cambios derivados de esta interacción aunque específicos, no siempre son importantes en relación con la inhibición de la actividad mitogénica del FGF por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰.

En la Figura 5, puede observarse cómo tras veinticuatro horas de incubación, el bFGF disuelto en una solución de fuerza iónica equi-

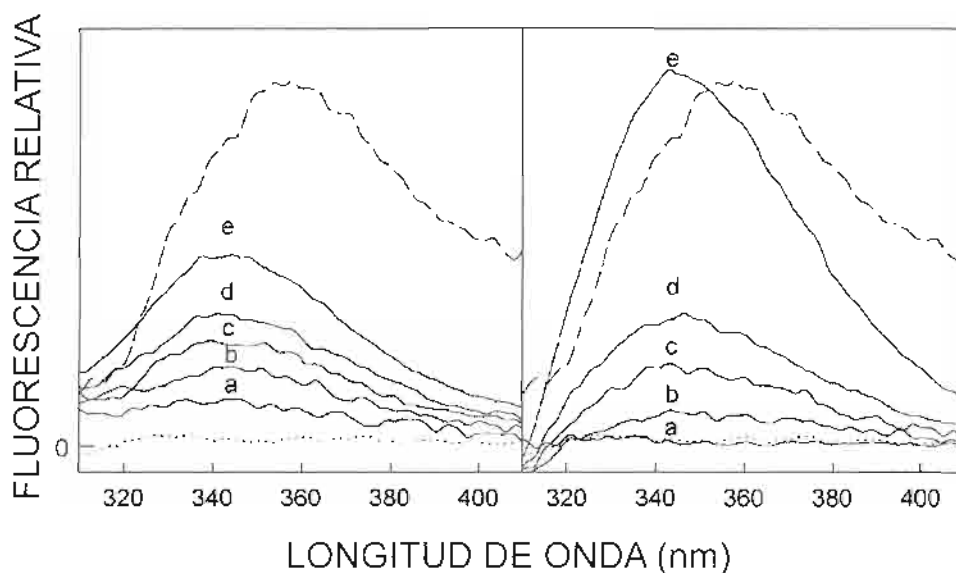


FIGURA 5. Aumento progresivo con la incubación de la fluorescencia del triptófano del bFGF en presencia del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y del PF4⁴⁷⁻⁵⁸. Los espectros fueron obtenidos sucesivamente al principio de la incubación (a), y a las 2 (b), 4 (c), 7 (d), y 22 horas (e). El espectro en línea de puntos corresponde al de una solución de bFGF a la que no se le ha añadido ninguno de los dos péptidos tras 24 horas de incubación. El espectro en línea de guiones corresponde al de una solución de bFGF desnaturizado por urea. Los espectros de la izquierda corresponden al tratamiento con PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y los de la derecha a los llevados a cabo con PF4⁴⁷⁻⁵⁸ (6).

valente a la del medio de ensayo de mitogénesis sigue sin apenas fluorescer. Igual ocurre si se incuba en presencia de PF4⁵⁴⁻⁷⁰. Sin embargo, en la misma figura puede observarse cómo se va produciendo un aumento considerable y progresivo de fluorescencia del bFGF, a lo largo de este periodo de incubación de 24 horas, si la incubación se lleva a cabo tanto en presencia de PF4⁴⁷⁻⁷⁰ como de PF4⁴⁷⁻⁵⁸. En este efecto parece que hay implicada una oxidación de grupos -SH pues puede prevenirse añadiendo a la mezcla de incubación compuestos que protegen a estos grupos de la oxidación. Se trata, sin embargo también de un proceso bastante específico pues no basta con sustituir el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ o el PF4⁴⁷⁻⁵⁸ simplemente por cisteína o glutatión reducidos. Tampoco está causado por la presencia de trazas de metales de transición en la mezcla de incubación, pues ocurre también en presencia de 5 mM de EDTA. El hecho además de que no induzca este proceso el PF4⁵⁴⁻⁷⁰ descarta también que se trate de un proceso mediado por una interacción con la hélice fuertemente anfipática del extremo carboxilo del PF4⁴⁷⁻⁷⁰. Como tanto el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ como el PF4⁴⁷⁻⁵⁸ tienen una cisteína libre podría uno verse tentado a adjudicarle a este residuo un papel crítico en la inducción de la fluorescencia del bFGF. Sin embargo, no debe olvidarse que en el bFGF también hay cuatro cisteínas libres. Podría también pensarse que es la oxidación de alguna de ellas la responsable del aumento de fluorescencia y que este proceso estuviera promovido por la interacción con la mera estructura primaria del PF4⁴⁷⁻⁷⁰. No obstante, estos cambios de fluorescencia inducidos por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y el PF4⁴⁷⁻⁵⁸ parecen irrelevantes a la hora de explicar el mecanismo de inhibición del bFGF por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰, pues como se expuso unos párrafos más arriba, el PF4⁴⁷⁻⁵⁸ que es un inductor de la fluorescencia del bFGF más potente incluso que el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ (Figura 5) no afecta a la actividad mitogénica del bFGF (Figura 4). Es más, como ilustra la Figura 6, la inhibición de la actividad mitogénica del bFGF por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ ocurre incluso en presencia de compuestos como el DTT que previenen la inducción de la fluorescencia del bFGF por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰.

Puede resultar sorprendente a primera vista que las alteraciones en la fluorescencia del bFGF inducidas tanto por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ como por el PF4⁴⁷⁻⁵⁸ no guarden relación alguna con su actividad mitogénica, pues las alteraciones de la fluorescencia del triptófano de los FGFs se han correlacionado directamente de forma habitual con su desna-

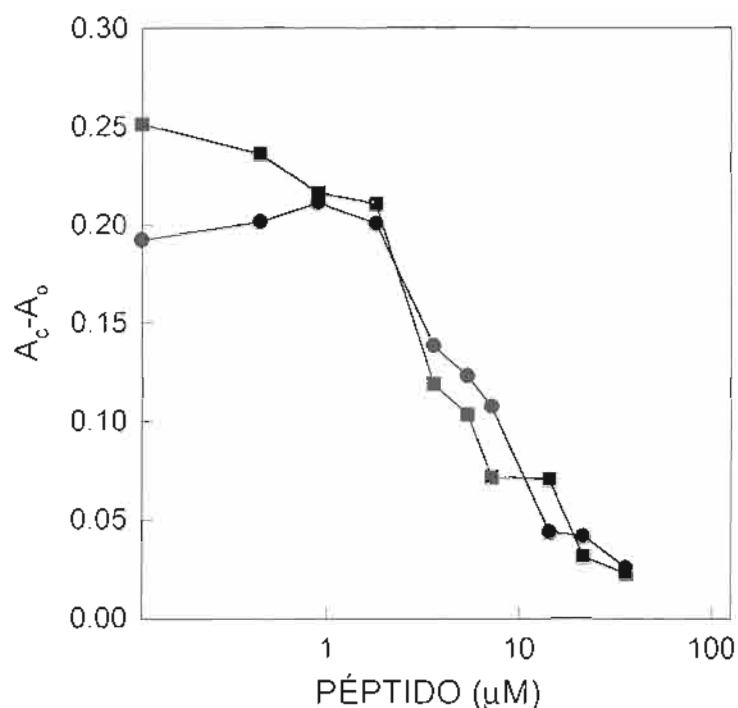


FIGURA 6. Inhibición por PF4⁴⁷⁻⁷⁰ de la mitogénesis inducida por bFGF en presencia de inhibidores de la oxidación de las cisteínas. El tratamiento de las células BaF3/FR1c-11 es como en la Figura 4, excepto que la incubación en este caso era sólo de 12 horas y el medio de incubación contenía en (●) 175 μM de DTT. Las gráficas representan la diferencia en número de células entre las incubaciones en presencia de bFGF (A_c) y en ausencia del mitógeno (A₀) a concentraciones crecientes de inhibidor (6).

turalización. Sin embargo, no es la primera vez que se ha observado que existen formas del FGF cuyo triptófano fluoresce intensamente y a la vez son mitogénicas (35). Hay que hacer notar además que tanto en el caso descrito aquí, como el acabado de citar, el máximo de la fluorescencia del triptófano del FGF mitogénicamente activo está a longitudes de onda claramente más cortas que el de la proteína tratada con agentes desnaturizantes (Figura 5), lo que claramente indica que existen formas del FGF cuyo triptófano fluoresce distintas de las formas desnaturizadas. Estas formas, obviamente, deben conservar todavía la estructura mínima requerida para inducir mitogénesis.

Los experimentos de fluorescencia ponen claramente de manifiesto que tanto el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ como uno de sus dominios interacciona con el FGF, independientemente de la importancia que ello pueda tener o no para la inhibición de la actividad mitogénica del bFGF. Es obvio que para la aparición de estas alteraciones de fluorescencia bastaría con interacciones entre los componentes implicados de vida media muy corta, aunque obviamente no puede descartarse de antemano el que se formen complejos estables del inhibidor con el bFGF, como parecen sugerir varios experimentos de biología celular (21, 23, 24). Toda una serie de estudios de ultracentrifugación analítica confirman que efectivamente el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ forma un complejo con el bFGF con una constante de disociación que debe andar por debajo del orden del micromol/litro. Sin embargo, estos experimentos no son capaces de detectar la formación de un complejo estable entre el PF4⁴⁷⁻⁵⁸ y el bFGF. Estos estudios sugieren obviamente que no es necesario que se produzca una asociación estable con el bFGF para inducir los cambios estructurales que dan lugar al aumento de fluorescencia de su único triptófano, mientras que la inhibición de la mitogénesis sí va acompañada de la formación de un complejo estable bFGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ con una estequiometría 1:1. Además estos experimentos ponen de manifiesto que el complejo bFGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ es menos estable que el bFGF aislado, sin que por otra parte la inhibición de la actividad mitogénica inducida por el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ sea una mera consecuencia directa de la desnaturalización del bFGF del complejo. En el caso del aFGF se ha visto también, mediante estudios de ultracentrifugación analítica, en las condiciones en que el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ inhibe su actividad mitogénica, que se forma el mismo tipo de complejo que en el caso del bFGF (6).

Los experimentos de ultracentrifugación analítica referentes a la interacción del bFGF con el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ aparecen resumidos en las Figuras 7 y 8. En la primera de las figuras aparecen consecutivamente los perfiles de sedimentación de una solución de PF4⁴⁷⁻⁷⁰, otra de bFGF y otra de una mezcla de los dos compuestos a concentraciones del primero a las que inhibe la actividad mitogénica (40 μ M) y a un exceso de inhibidor de 4:1. Los dos primeros perfiles corresponden a partículas sedimentantes de un $\bar{M}_{w,d}$ de ≈ 2880 y ≈ 17600 , respectivamente, valores muy próximos a los M_s calculados para el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y el bFGF respectivamente, en base a su composición de aminoáci-

dos (2785 y 17200). El tercer perfil corresponde al de una partícula sedimentante de un $\overline{M}_{w,0}$ de ≈ 20400 , un valor que coincide con bastante exactitud con el de un complejo bFGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ con una estequiometría 1:1. Los experimentos de equilibrio de sedimentación resumidos en la Figura 7 están todos realizados en presencia de un protector de la oxidación de las cisteínas (DTT; 200 μ M). La omisión de este compuesto de la mezcla (no cuando cada uno de los componentes se ultracentrifuga individualmente) lleva a la precipitación de ambos, lo que sugiere que la formación del complejo va unida al aumento de la reactividad de una o varias de las cisteínas del complejo con una subsiguiente pérdida de la estabilidad de la solución. Como la actividad inhibitoria del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ es equivalente en ausencia y presencia de DTT (Figuras 5 y 6), parece obvio concluir que la inhibición de la actividad mitogénica del bFGF no es una mera consecuencia directa de su precipitación.

En la Figura 8 aparecen representados los resultados de los experimentos de velocidad de sedimentación. En ellos podemos apreciar la evolución medida cada doce minutos de los perfiles de sedi-

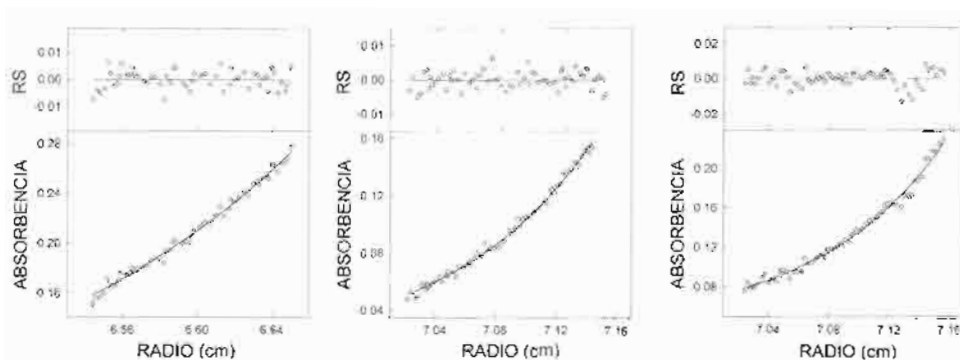


FIGURA 7. Efecto del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ en el equilibrio de sedimentación del bFGF. Los perfiles de sedimentación (paneles inferiores de la figura) corresponden a soluciones de PF4⁴⁷⁻⁷⁰ (izquierda), bFGF (centro) y de una mezcla 4:1 de PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y bFGF (derecha). Los símbolos corresponden a los datos experimentales (absorbancia de la muestra a 277 nm de la superficie al fondo del tubo de la centrifuga, hacia valores crecientes de gravedad) y las líneas continuas al ajuste de los datos experimentales a la ecuación que describe la distribución radial de un soluto ideal en condiciones de equilibrio de sedimentación. Las diferencias entre los datos calculados y los experimentales (RS) están representados en los paneles superiores de la figura (6).

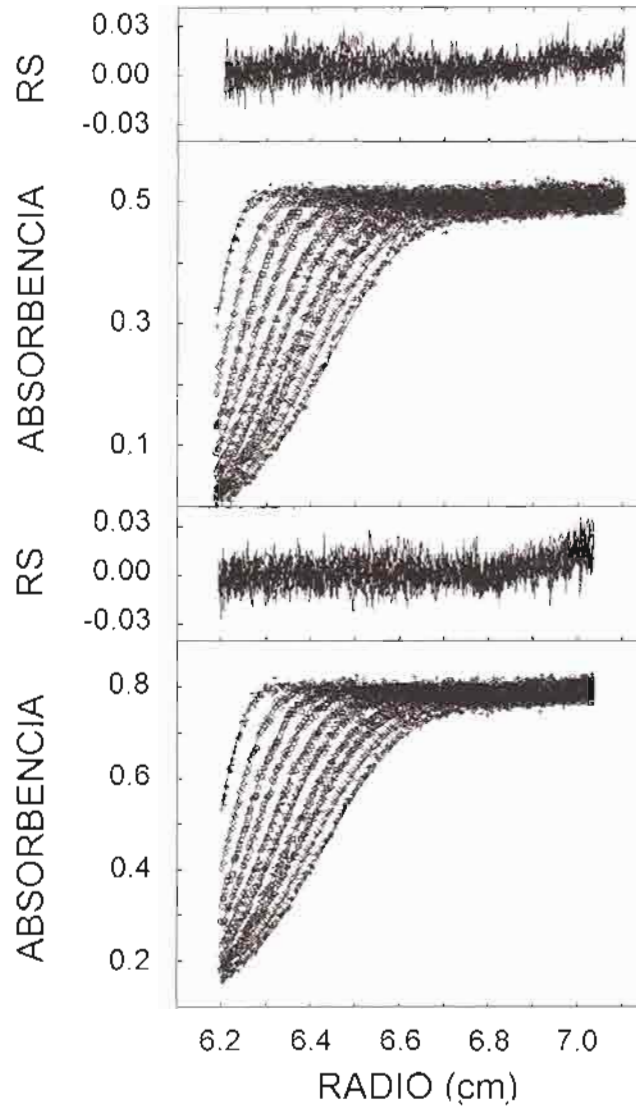


FIGURA 8. Efecto del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ en la velocidad de sedimentación del bFGF. Los perfiles de absorbencia (véase la leyenda de la figura anterior) corresponden al de una solución de bFGF (panel superior) y el de una mezcla 4:1 de PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y bFGF (panel inferior) medidos cada 12 minutos a lo largo de 2 horas. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas representan el perfil teórico calculado con el valor del coeficiente de sedimentación de la partícula ($s_{20,w}$) que hace que la raíz cuadrada de la diferencia entre los valores teóricos y los experimentales (RS) sea mínimo (6).

mentación de una solución de bFGF (figura superior) y otra de bFGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ (figura inferior) en la centrífuga analítica a lo largo de dos horas. Los valores de $s_{20,w}$ correspondientes a cada una de las soluciones calculadas a partir de la evolución de los perfiles de sedimentación ponen de manifiesto que la formación del complejo bFGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ va acompañada de una ligera modificación de la forma de la partícula, pues los valores de $s_{20,w}$ de 2.06 S en el caso de la solución de bFGF y 1.84 S para el complejo bFGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰, llevan a calcular relaciones de f/f_0 de 1.06 en el primer caso y de 1.30 en el segundo. Este aumento en fricción con respecto al que tendría una esfera rígida del mismo $\bar{M}_{w,n}$ implica obviamente que el comportamiento hidrodinámico del complejo se aleja claramente del de una forma esférica ($f/f_0=1$) (37), como es aproximadamente la de la molécula de bFGF (38). Cuando estos estudios se llevan a cabo utilizando aFGF se obtienen resultados equivalentes (6).

La formación del complejo FGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ va acompañado claramente de un cambio de forma de la partícula sedimentante. Este cambio de forma podría ser debido a la mera yuxtaposición de los volúmenes del FGF y el PF4⁴⁷⁻⁷⁰ al formarse el complejo. No obstante, no puede descartarse que esta yuxtaposición de volúmenes vaya acompañada también de una alteración de la estructura tridimensional del factor de crecimiento al formarse el complejo. La modificación de las interacciones químicas de determinados átomos del aFGF profundamente enterrados en el núcleo de la proteína, de acuerdo con determinados estudios de resonancia magnética nuclear (¹H-¹⁵N HSQC), parece indicar que la unión del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ altera ciertamente la conformación del FGF (6). Además, como algunas de las diferencias claramente significativas en desplazamientos químicos observadas en estos últimos experimentos corresponden a residuos situados en extremos opuestos del núcleo de la proteína, el cambio de forma parece que debe ser bastante global. Estos cambios además tal vez podían explicar la inhibición de la actividad mitogénica del FGF pues algunos de ellos corresponden a residuos implicados directamente con la unión del FGF al receptor celular de alta afinidad (39, 40).

CONSIDERACIONES FINALES

El conjunto de datos estructurales disponibles hasta este momento del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y del complejo FGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ podría permitir proponer un modelo mínimo de las bases estructurales de la actividad inhibidora del PF4 de la mitogénesis inducida por el FGF. La comparación de la estructura tridimensional del PF4 (23) con la del PF4⁴⁷⁻⁷⁰ pone de manifiesto que la hélice- α del extremo carboxilo del PF4 (Ala57-Ser70) (25), que queda muy expuesta al solvente, se conserva en el PF4⁴⁷⁻⁷⁰. Los residuos que preceden a la Ala57 en el PF4 que forman un lazo y una lámina- β . A partir de la Leu55, están profundamente enterrados en el núcleo del tetrámero de PF4 (25). A partir de la comparación de ambas estructuras parecería lógico proponer que la hélice- α limitada por los residuos Ala57 y Ser70, es el motivo estructural del PF4 responsable de su actividad inhibidora de la mitogénesis del FGF. Sin embargo, nosotros hemos puesto de manifiesto que este fragmento por sí mismo carece de actividad antimitótica.

Conviene, no obstante, destacar que la estructura tridimensional del PF4 que hay descrita (25) quizá no se corresponda con la de la forma realmente antiangiogénica de la proteína, pues Gupta *et al.* (41) aislaron una forma de PF4 considerablemente más antiangiogénica. En consecuencia, la elaboración de un modelo de las bases estructurales de la actividad antimitótica del PF4 en base a la estructura tridimensional que en estos momentos hay descrita (25) quizá no se trate de una aproximación correcta. De acuerdo con los datos que suministran Gupta *et al.* en su artículo es probable que el PF4 requiera de la hidrólisis del enlace peptídico entre la Thr16 y Ser17 para adquirir su actividad antiangiogénica. Estos residuos están incluidos en una región de la proteína que adopta una estructura parecida a la de una lámina- β que interacciona con otra equivalente de otra subunidad del tetrámero dando lugar a una lámina- β (42). El efecto de la hidrólisis del enlace peptídico entre la Thr16 y la Ser17 en la interacción entre monómeros adyacentes del tetrámero aun no ha sido descrita, pero obviamente puede tener consecuencias importantes pues la lámina- β en que se integran estos residuos debe jugar un papel importante en la estabilización de la estructura cuaternaria del PF4. Es más, puede ser que la hidrólisis del enlace peptídico entre la Thr16 y la Ser17 afecte también a la mera estructura de las

subunidades del tetrámero, pues la lámina- β en la que se integran estos dos residuos, que quedaría destruida tras la hidrólisis, interactúa estrechamente con la hélice- α comprendida entre los residuos Ala57 y Ser70. La desaparición de esta interacción podría tener, obviamente, importantes consecuencias estructurales a nivel de subunidad y podría llevar a que una porción del segmento que precede a la Leu55, que no es accesible a la superficie del PF4 en el que el enlace entre la Thr16 y Ser17 no ha sido hidrolizado, quede expuesto al solvente tras esta hidrólisis. De esta forma la activación de la actividad antiangiogénica del PF4 podría consistir en exponer al solvente un dominio equivalente al PF4⁴⁷⁻⁷⁰ total. No es descabellado pensar que este proceso pueda ocurrir también de forma menos específica a lo largo del dilatado periodo de incubación de los experimentos de mitogénesis, pues la lámina- β a la que pertenecen la Thr16 y la Ser17 está muy expuesta al solvente y contiene enlaces peptídicos que pueden ser blanco de proteasas comunes muy diversas. Es obvio que la confirmación de esta hipótesis requiere al menos que las estructuras del complejo FGF:PF4⁴⁷⁻⁷⁰ y del PF4 activado estén resueltas. De lo que no parece haber duda es del interés farmacológico que pueden tener estos estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BIKFALVI, A., KLEIN, S., PINTUCCI, G. AND RIFKIN, D.B. (1997) *Endocr. Rev.* 18: 26-45.
- (2) FERRARA N. (1999) *J. Mol. Med.* 77: 527-543.
- (3) NISHIMURA, T., UTSUNOMIYA, Y., HOSHIKAWA, M., OHUCHI, H. AND ITOH, N. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1444: 148-151.
- (4) COULIER, F., PONTAROTTI, P., ROUBIN, R., HARTUNG, H., GOLDFARB, M. AND BIRNBAUM, D. (1997) *J. Mol. Evol.* 44: 43-56.
- (5) THOMAS, K. A. AND GIMÉNEZ-GALLEGO, G. (1986) *Trends Biochem. Sci.* 11: 1-4.
- (6) LOZANO, R. M., REDONDO-HORCAJO, M., JIMÉNEZ, M. A., ZILBERBERG, L., CUEVAS, P., BIKFALVI, A., RICO, M. AND GIMÉNEZ-GALLEGO, G. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 35723-35734.
- (7) MOSCATELLI, D. (1987) *J. Cell. Phys.* 131: 123-130.
- (8) JAYE, M., SCHLESSINGER, J., AND DIONNE, C.A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta.* 1135: 185-199.
- (9) FANNON, M. AND NUGENT, M.A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 17949-17956.
- (10) ORNITZ, D. M (2000) *Bioessays*, 22, 108-112.
- (11) JONCA, F., ORTEGA, N., GLEIZES, P. E., BERTRAND, N. AND PLOUET, J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 24203-24209.