

MEMORIAS  
DE LA  
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS Y ARTES  
DE BARCELONA

TERCERA ÉPOCA NÚM. 1.016

VOL. LXIII NÚM. 10

---

RECONeixEMENT MOLECULAR DE SUPERFÍCIES PROTEIQUES

MEMÒRIA LLEGIDA PER L'ACADÈMIC ELECTE

Dr. ERNEST GIRALT LLEDÓ

A l'acte de la seva recepció el dia 12 de juny de 2008

DISCURS DE RESPOSTA PER L'ACADÈMIC NUMERARI

Excm. Sr. Dr. JOSEP FONT CIERCO

*Publicada el mes de Juny de 2008*

B A R C E L O N A

2 0 0 8

Reial Acadèmia de Ciències i Arts de Barcelona  
1ª edició: juny de 2008  
Tiratge: ??? exemplars  
D.L.: B -2020- 59  
ISBN: 0368-8283  
Producció: 9.disseny s.l.

## RECONeixEMENT MOLECULAR DE SUPERFÍCIES PROTEIQUES

MEMÒRIA LLEGIDA PER L'ACADÈMIC ELECTE

Dr. ERNEST GIRALT LLEDÓ

A l'acte de la seva recepció el dia 12 de juny de 2008

Excel·lentíssim Senyor President,  
Excel·lentíssims senyors acadèmics,  
Col·legues universitaris,  
Benvolguts familiars i amics:

En primer lloc, vull expressar el meu profund agraïment a la Reial Acadèmia de Ciències i Arts de Barcelona per l'honor que em fa en convidar-me a ser-ne un dels membres. Permetin-me mencionar els noms dels senyors acadèmics Josep Castells, Josep Font i Joan Bertrán, que, de segur, han tingut un paper important amb relació a aquesta proposta. Vull agrair d'una manera especial a Josep Font el fet d'haver acceptat la tasca de respondre al meu discurs en nom de l'Acadèmia.

### LES PROTEÏNES: FUNCIONAMENT EN XARXA

Aquesta memòria se centra en el reconeixement molecular de superfícies proteiques.

Les proteïnes són molècules formades per la unió de diferents aminoàcids. Una proteïna mitjana pot estar formada per uns 500 aminoàcids i té un pes molecular d'uns 70 000 g/mol. Hi ha proteïnes molt més grans —amb un pes molecular d'un milió— i molt més petites —per exemple, a la figura 1 es representa l'estructura tridimensional de la proteïna P41icf, un inhibidor molt potent de l'enzim humà catepsina L. Aquesta proteïna és de les petites; només té 70 aminoàcids. Fa uns anys Cristina Chiva va determinar, al nostre laboratori i mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN), l'estructura de P41icf (figura 1). Prèviament l'havia sintetitzat combinant tècniques de síntesi en solució i síntesi sobre suport polimèric.<sup>1</sup> Aquest és un exemple del fet que actualment l'estudi químic de les proteïnes es pot dur a terme amb les mateixes eines que fem per a qualsevol altre compost orgànic: síntesi, RMN, espectrometria de masses (EM), etc.

Des de fa molt de temps sabem que les proteïnes tenen un paper cabdal en els éssers vius que trobem en la nostra biosfera. Algunes, com el col·lagen, tenen un paper estructural

molt important. D'altres, com ara els enzims o les hormones, destaquen per la capacitat de catalitzar reaccions orgàniques o d'interaccionar amb receptors per tal d'assegurar la comunicació entre cèl·lules.

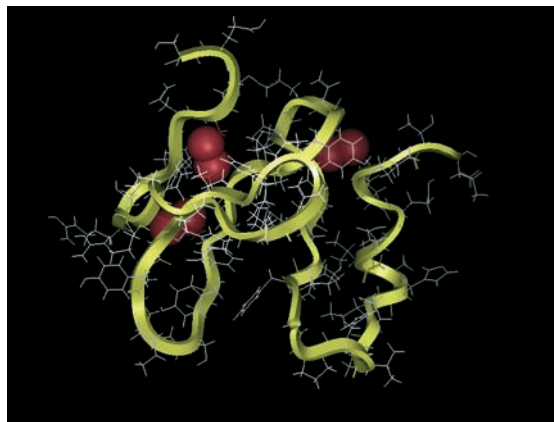


Fig. 1. Estructura tridimensional de la proteïna P41icf.<sup>1</sup>

En canvi és molt més nou el descobriment que les proteïnes rarament actuen de manera individual a l'interior d'una cèl·lula, sinó que ho fan en forma de complexos. L'estudi del genoma humà, el segle passat, ha anat seguit de l'estudi del proteoma, i és aquí on ha sorgit la sorpresa de trobar que les proteïnes actuen, de manera general, mitjançant aquests complexos multiproteïcs en els quals una determinada proteïna està enllaçada no covalentment a cinc, a sis..., o a deu proteïnes més.

Com s'uneixen dues proteïnes? Per què d'entre els milers de proteïnes que té al seu abast una proteïna determinada selecciona aquestes cinc i cap altra? Com es dissenyen i sintetitzen compostos amb capacitat per a evitar una unió proteïna-proteïna o, a l'inrevés, per a forçar una unió proteïna-proteïna quan sigui això el que ens interessa. En totes aquestes qüestions, el reconeixement molecular de superfícies proteïques hi té un paper clau i al llarg de la meua exposició els presentaré la modesta contribució que el nostre laboratori ha dut a terme aquests darrers anys en aquest camp.

Una qüestió prèvia. Encara que la manera més habitual de representar l'estructura de les proteïnes és la que es mostra en la figura 1, no sempre és la més adequada quan volem parlar de reconeixement molecular. És com un nano davant d'un carretó ple de l·laminadures en una parada de mercat. Per a decidir quina vol triar, no li importa com està construïda la parada.

Aquesta altra representació (figura 2) mostra molt millor la superfície de la proteïna. Es tracta novament de la P41icf i he utilitzat el mètode computacional de Connolly.<sup>2</sup> Consisteix a aprofitar de manera virtual una esfera de diàmetre determinat a diferents punts de

la superfície de la proteïna. Quan l'esfera és a l'infinit no hi ha interacció i quan s'apropa massa hi ha repulsió. Si s'uneixen tots els punts on l'energia d'interacció és zero s'obté la superfície de Connolly. En aquest cas he triat una esfera de diàmetre equivalent a una molècula d'aigua i he acolorit la superfície resultant seguint una escala d'hidrofobicitat. És a dir, vermell vol dir molt hidrofòbic, molt apolar; en canvi blau vol dir molt hidrofílic, molt polar. La P41icf interacciona amb el seu receptor —que és la catepsina L— per tres zones. Si ens fixem en dues d'aquestes zones ens trobem amb el mateix patró: un aminoàcid molt hidrofòbic al centre, voltat d'una anella procedent d'aminoàcids de polaritat intermèdia.

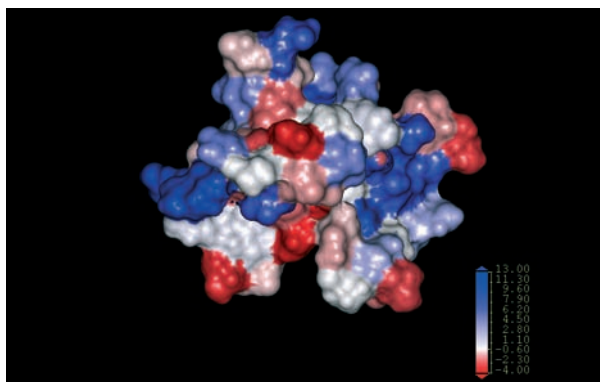


Fig. 2. Superfície de Connolly de la proteïna P41icf.<sup>2</sup>

Cal pensar que la interacció proteïna-proteïna en aquestes zones estarà governada per interaccions no covalents de tipus Van der Waals o enllaç hidrofòbic. Tanmateix, si girem la molècula 180° al voltant d'un eix vertical, ens trobem la tercera zona d'interacció amb el receptor. Es tracta d'una zona molt polar. Concretament està formada per aminoàcids carregats positivament com l'arginina. Cal esperar que el reconeixement molecular entre la P41icf i el seu receptor utilitzi ara interaccions no enllaçants de tipus electrostàtic, enllaç d'hidrogen; potser  $\pi$ -catió, etc.

Amb aquest exercici tan senzill ens hem trobat amb un exemple del que en realitat és un comportament general. La interacció proteïna-proteïna implica retalls de superfície (*surface patches*) tant hidrofílics com hidrofòbics.

## INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA

Quan es treballa en el camp del reconeixement molecular, cal ser molt humil. Agafem l'exemple de la proteïna anomenada *uteroglobina* (figura 3). Es tracta d'un dímer format per dues còpies idèntiques de 70 aminoàcids cadascuna, unides covalentment per dos

enllaços disulfur, és a dir, sofre-sofre. Una manera d'investigar estructures desconegudes és desmuntant-les i tornant-les a muntar. Podem fer això amb l'uteroglobina: trenquem aquests dos enllaços disulfur i ens trobem que les dues meitats continuen unides en solució, ara de manera no covalent, formant un dímer amb una estructura i unes propietats molt semblants a les de la proteïna nadiua. També podem trencar la molècula entre dos aminoàcids (figura 3). En realitat el que hem fet al laboratori és sintetitzar els trossos. Aquest és treball d'Ernesto Nicolás.<sup>3</sup> Quan sintetitzem l'hemiuteroglobina de la figura 3, dues còpies d'aquesta hemiuteroglobina s'uneixen no covalentment i donen lloc a una estructura globular molt semblant a la de la proteïna nadiua. Però, encara més, si sintetitzem el pèptid gris i el pèptid taronja separatament i els posem junts en condicions oxidants perquè es formi l'enllaç sofre-sofre, observem que la reacció és terriblement selectiva. Aquest cromatograma (fig. 4) és, podríem dir, una fotografia instantània del que està passant en un moment donat de la reacció. El pic gran (c) és l'heterodímer gris-taronja. Els dos pics mitjans (a, b) són monòmer gris i monòmer taronja, que encara no han reaccionat, i els senyals molt poc intensos (d, e) són els homodímers «no productius»: gris-gris i taronja-taronja (fig. 3). En definitiva, la seqüència d'aminoàcids de la uteroglobina optimitzada al llarg de milers d'anys d'evolució —conté una quantitat enorme de reconeixement molecular— permet que, encara que es trenqui en trossos, es recuperi una estructura globular molt semblant a la nadiua. Quan parlo d'humilitat em refereixo a que estem molt lluny, per exemple, de poder dissenyar sistemes que tinguin aquestes propietats de reconeixement molecular. El problema de fons és, òbviament, que aquests processos de reconeixement molecular són el resultat de la suma de «moltes» interaccions no covalents, cadascuna de les quals és molt feble, però que sumades tenen una gran força. Malauradament, en el moment actual només som capaços d'identificar la presència d'aquestes interaccions algunes vegades, però l'estimació quantitativa de la seva magnitud tan sols la podem efectuar amb un gran error. Quan sumem moltes estimacions individuals errònies, l'error de l'energia d'interacció total és enorme.

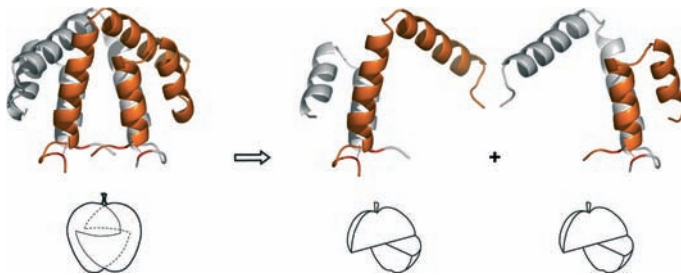


Fig. 3. La proteïna uteroglobina i la seva bisecció en dues meitats a la manera de la *coupe du roi*.<sup>3</sup>

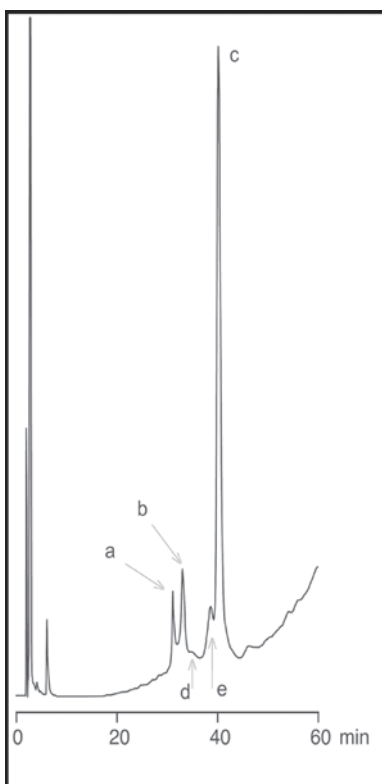


Fig. 4. Tetramerització espontània dels pèptids que formen l'estructura de la uteroglobina.<sup>3</sup>

Considerem un segon exemple d'estudis de reconeixement molecular utilitzant aquest principi de trencar i enganxar. Es tracta d'un domini de la proteïna A de *Staphylococcus aureus*. Tal com es veu en la figura 5, es tracta d'un domini d'uns 60 aminoàcids que formen tres hèlixs  $\alpha$ . Giovana Granados molt recentment ha sintetitzat aquest domini al nostre laboratori i ha elaborat un fragment format per les hèlixs II i III. A continuació, fent servir una versió de la química combinatòria anomenada «una bola / un compost», ha sintetitzat una quimioteca, és a dir, una col·lecció de compostos químics formada per 300 variants de l'hèlix 3.<sup>4</sup>

D'aquestes 300 variants, n'hi ha tres que interaccionen fortament amb les hèlixs II i III. Una d'aquestes seqüències és precisament la de la proteïna A nadiua. Les altres dues presenten algunes mutacions. Giovana Granados ha sintetitzat aquests nous dominis formats per tres hèlixs unides, ara ja, covalentment. Quan s'estudien per RMN, s'observa que estan tan ben plegats com el domini nadiu. Quan s'aplica la ressonància de plasmó superficial per a estudiar la interacció amb anticossos es veu que aquests nous dominis tenen la capacitat d'unió característica de la proteïna A. En definitiva, fent servir molt

poc disseny, utilitzant la força bruta de la química combinatòria, hem pogut, malgrat la nostra ignorància, redissenyar un domini de la proteïna A que es plega igualment i té les mateixes propietats que la proteïna nadiua. Aquest, diria jo, és l'estat de l'art en aquest camp en el moment actual.

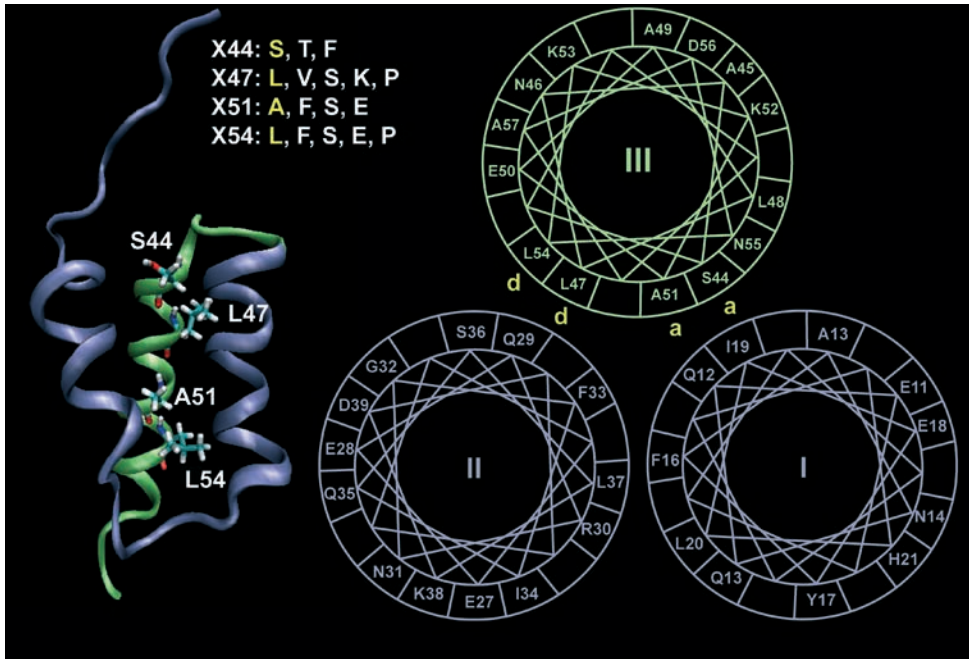


Fig. 5. Estructura tridimensional del domini de la proteïna A de *S. aureus*.<sup>4</sup>

La interacció narcisista d'una proteïna amb si mateixa per a donar grans agregats anomenats *fibril·les amiloides* és a l'origen d'un grup molt important de malalties anomenades *malalties conformacionals*, com l'Alzheimer, el Parkinson o la diabetis més freqüent, la diabetis de tipus II.<sup>5</sup>

L'estructura atòmica d'aquestes fibril·les amiloides encara no es coneix. Només se sap que cadenes d'aminoàcids adopten estructures esteses del tipus cadena  $\beta$ , i que cadenes de diferents molècules s'uneixen entre si mitjançant enllaços d'hidrogen que segueixen la direcció de creixement de la fibril·la. Aquest procés de reconeixement molecular és molt complex, tal com ha posat de manifest Muriel Arimon del nostre laboratori, analitzant mitjançant microscòpia de força atòmica (AFM) les diverses fases de formació de la fibril·la per al cas de la proteïna  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ 1-42), l'agregació de la qual està en l'origen de la malaltia d'Alzheimer.<sup>6</sup> Per la seva banda, Natàlia Carulla al nostre laboratori, en col·laboració amb els grups de Chris Dobson i Carol Robinson a la Universitat de Cambridge, ha estu-

diat les propietats dinàmiques de les fibril·les amiloides un cop formades, combinant les tècniques d'espectrometria de masses i de ressonància magnètica nuclear.<sup>7</sup> El resultat és que, contràriament al que tothom esperava, les fibril·les amiloides són molt dinàmiques; és a dir, creixen i decreixen de manera contínua perquè constantment hi ha molècules de la fibril·la que passen a la solució, i vice-versa. Això, òbviament, són bones notícies amb vista al futur, ja que vol dir que si fóssim capaços de trobar inhibidors de l'agregació de les proteïnes amiloides ens trobaríem davant d'un tractament no sols preventiu sinó fins i tot curatiu per a aquestes malalties.

Al nostre laboratori, des de fa més de deu anys, amb l'ajut econòmic de la Fundació La Marató de TV3 i la Fundació La Caixa, estem intentant desenvolupar pèptids —és a dir, proteïnes molt petites— capaços d'inhibir l'agregació de la proteïna A $\beta$ 1-42 de la malaltia d'Alzheimer. Ara fa un parell d'anys, Marcelo Kogan —actualment professor a la Facultat de Farmàcia a Santiago de Xile—, quan encara treballava al nostre laboratori, va «decorar» nanopartícules d'or amb petits pèptids inhibidors d'agregació —es tracta de petites nanopartícules d'or de 14 nm de diàmetre. En incubar les nanopartícules amb proteïna  $\beta$ -amiloide es formaven fibril·les que havien incorporat totes les nanopartícules d'or. Si ara irradiem les fibril·les amb microones —a una freqüència a la qual l'or absorbeix, però l'aigua no—, observem com les fibril·les es destrueixen. Més recentment, Dolors Grillo ha aconseguit el mateix resultat sense necessitat de radiació, utilitzant pèptids formats per aminoàcids D. El mecanisme de la interacció entre els inhibidors i la fibril·la en creixement l'estem estudiant no pas experimentalment sinó per simulació amb ordinador, mitjançant tècniques de dinàmica molecular. La utilització en el disseny d'aminoàcids D —que són la imatge especular dels aminoàcids naturals— garanteix que aquests pèptids no seran degradats per les peptidases de la sang. Es poden veure, per tant, com a potencials fàrmacs. Queda, però, encara molt camí per fer. La primera etapa d'aquest camí són estudis amb ratolins transgènics —models d'Alzheimer— que estem duent a terme en col·laboració amb el grup del doctor Isidre Ferrer a l'Hospital de Bellvitge.

## DISSENY DE LLIGANDS PER AL REONEIXEMENT DE SUPERFÍCIES PROTEIQUES

Fins ara he parlat d'interaccions proteïna-proteïna; processos molt importants des d'una perspectiva de ciència bàsica. En el cas dels inhibidors d'agregació de la proteïna  $\beta$ -amiloide, hem vist ja un primer cas de disseny de lligands per al reconeixement de superfícies proteiques. Aquest aspecte òbviament és molt important des d'un punt de vista de ciència aplicada. Vegem-ne altres exemples.

La proteïna P53 és el que podem anomenar un *factor antitumoral natural*. Si en una cèl·lula es produeixen lesions al DNA —i, per tant, risc de càncer— P53, comença un

procés de reparació d'aquest DNA danyat. Si la reparació no té èxit, P53 provoca el «suïcidi» de la cèl·lula —tècnicament, la mort cel·lular programada o apoptosi. No és estrany, doncs, que en més del 50 % de malalts de càncer ens trobem mutacions a P53. Si P53 no funciona correctament hi ha molta més tendència a patir càncer. Moltes d'aquestes mutacions són hereditàries.

P53 és un tetràmer no covalent format per quatre còpies idèntiques de la proteïna. A la figura 6 es representa l'estructura tridimensional del domini de tetramerització. L'estructura es va determinar mitjançant RMN al laboratori d'Angela Gronenborn als EUA.<sup>9</sup> Algunes de les mutacions relacionades amb càncer se situen precisament en aquest domini de tetramerització. Aquest és el cas de la mutació de l'aminoàcid arginina 337 per histidina. Aquesta mutació és freqüent al sud del Brasil i és a l'origen de l'alta incidència de carcinoma adrenal pediàtric. Aquesta mutació és, precisament, la que estem estudiant al nostre laboratori. Susana Gordo ha sintetitzat les dues versions del domini de tetramerització de la P53: la salvatge i la mutada. Per a comprovar la pèrdua d'estabilitat del tetràmer causada per la mutació, ha dut a terme molts experiments de RMN, dicromisme circular i microcalorimetria. Per exemple, els resultats de dicromisme circular mostren com l'estabilitat de la forma mutada depèn del pH —depèn de l'estat de protonació de l'anell imidazole de la histidina— i com la forma salvatge és molt més estable. En col·laboració amb el laboratori de Javier de Mendoza, a l'ICIQ a Tarragona, hem intentat dissenyar i sintetitzar lligands que, en unir-se a la P53 mutada, siguin capaços de «rescatar» l'estabilitat de la proteïna. Això ho hem aconseguit —són resultats molt recents encara no publicats— amb aquests composts amb forma de vas anomenats *calixarens*. Com es veu tant per dicromisme circular com per microcalorimetria, en afegir quantitats creixents de calixarè, la P53 mutada es torna pràcticament tan estable com la salvatge (figura 7). De fet, fins i tot la proteïna salvatge s'estabilitza uns simbòlics 4 graus o 6 graus en presència del calixarè. La RMN, concretament la tècnica anomenada «de diferència de transferència de saturació» (STD), ens permet localitzar els àtoms del lligand que estan més en contacte amb la proteïna. El resultat és compatible amb el model utilitzat per al disseny: contactes hidrofòbics calixarè-proteïna a l'interior d'aquesta cavitat i interaccions electrostàtiques entre els quatre grups guanidini, carregats positivament, del calixarè i els quatre grups carboxilat negatius que estan situats a la cresta de la cavitat (figura 8).

Arribats a aquest punt de la meva exposició, m'agradaria obrir un petit parèntesi per a comentar un parell d'aquests aspectes metodològics relatius al disseny dels lligands i a l'estudi de la seva interacció amb les proteïnes.

Pel que fa al disseny de lligands, els exemples que he comentat fins ara podríem dir que responen a una aproximació «artesanal». Es basen en l'observació detallada de les propietats de la superfície proteica i en el disseny, combinant imaginació i sentit comú, de molècules que proporcionin un conjunt d'interaccions no covalents favorables. Tot plegat es tracta, però, d'una aproximació qualitativa.

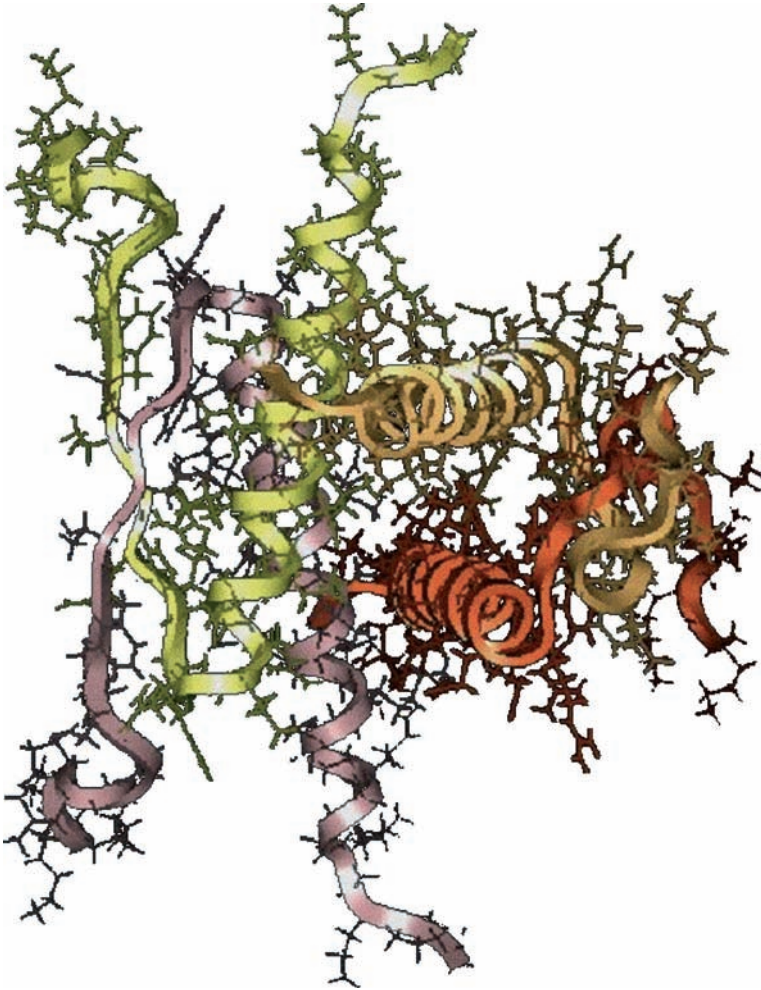


Fig. 6. Domini de tetramerització de la proteïna P53.

Aquests darrers anys amb Ignasi Belda i Sergio Madurga, al nostre laboratori, hem estat implementant una aproximació automàtica i quantitativa al disseny de lligands per a superfícies proteïques. El nou mètode està basat en l'ús d'algorismes evolutius. Partim d'una primera generació de, diguem-ne, 50 pèptids generats a l'atzar. A continuació, mitjançant mètodes computacionals anomenats de *docking*, cadascun dels pèptids s'encaixa sobre la superfície de la proteïna, es calcula l'energia d'interacció i es classifiquen els pèptids de millor a pitjor. A partir d'aquí es posa en marxa l'algorisme evolutiu. El resultat és la

formació d'una segona generació formada per 50 individus —50 pèptids— generats a partir dels 50 pèptids precedents, utilitzant mecanismes com ara mutacions (canvi d'un aminoàcid per un altre); encreuaments (és a dir, agafar un tros d'un pèptid i un tros d'un altre) i criteris com ara elitisme (és a dir, utilitzar com a material de partida per a la segona generació només els millors individus o, per contra, donar també oportunitats als individus pitjors; per cert, que un aprèn de seguida a no ésser massa elitista). Els individus de la segona generació s'avaluen *in silico* mitjançant *docking*, es classifiquen i s'utilitzen per a generar la tercera generació, i així successivament, fins a arribar a un conjunt de pèptids que *in silico* —a la pantalla de l'ordinador— es comporten d'una manera excel·lent. Cal aleshores «baixar» a la realitat del laboratori.

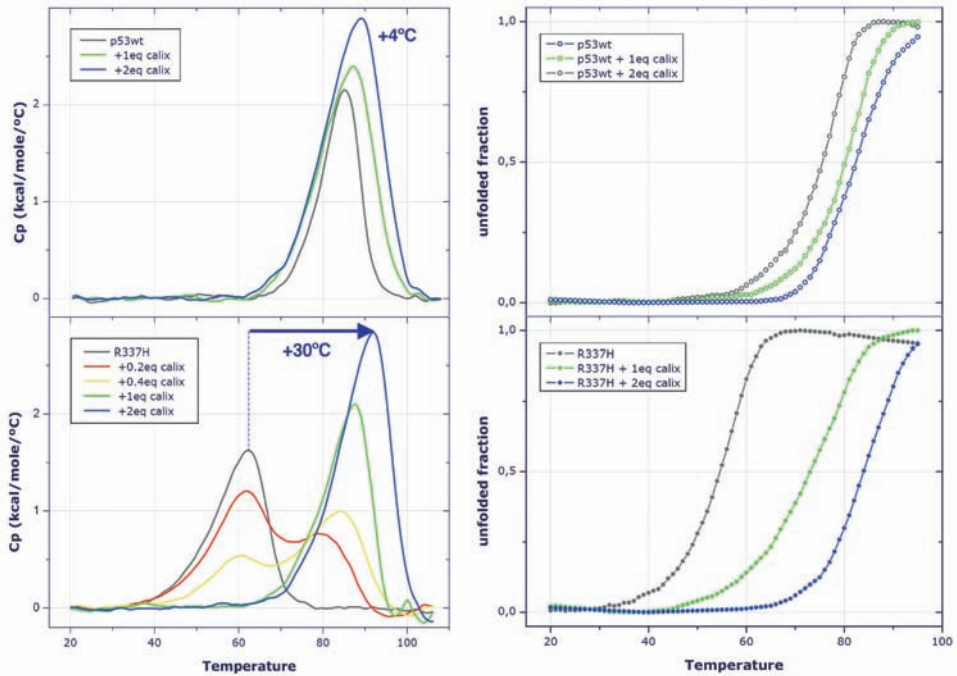


Fig. 7. Interacció d'un calixarè amb el domini de tetramerització de P53 estudiada per difracció circular i microcalorimetria.

L'accés al Mare Nostrum ha estat cabdal per a aquest projecte metodològic. L'espai de cerca, és a dir el nombre de pèptids teòricament possible és enorme. La utilització en paral·lel de molts processadors ens permet explorar proporcions més grans d'aquest espai de cerca. Típicament, utilitzem de manera simultània 500 processadors i fem servir poblacions de 500 pèptids, un per processador.

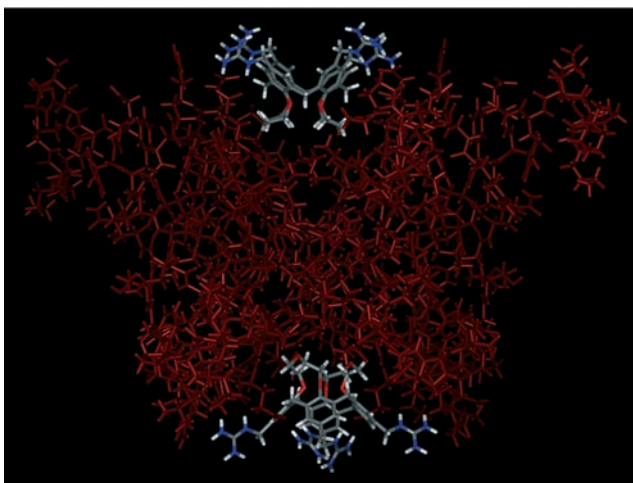


Fig. 8. Model de la interacció de dues molècules de calixarè amb el domini de tetramerització de P53.

Gràcies a l'esforç d'aquests darrers sis anys, el mètode està ja molt perfeccionat des d'un punt de vista informàtic. A més, funciona bé tant amb aminoàcids naturals com amb aminoàcids no naturals; per exemple, aminoàcids D o aminoàcids *N*-metilats.<sup>10,11</sup> El «taló d'Aquil·les» del mètode és, però, l'etapa del *docking*. A causa de la nostra manca de coneixement en el món de les interaccions no covalents, l'estimació de l'energia d'enllaç mitjançant mètodes computacionals és encara poc acurada i això sovint dóna lloc a previsions errònies. Val a dir, però, que tots els avenços en aquesta àrea del coneixement molecular es tradueixen en algorismes de *docking* cada vegada millors. En certa manera, aquest projecte és com el vi; anirà millorant amb els anys simplement si s'utilitzen com a mòdul de *docking* algorismes cada vegada millors.

Pel que fa a l'avaluació “real” —al laboratori— de la interacció entre lligands i proteïnes, el nostre grup de recerca ha fet un esforç per tal de potenciar al màxim l'ús de la RMN. Tal com el nom indica, la ressonància magnètica nuclear es basa en l'estudi de les propietats magnètiques dels nuclis. El nucli de l'àtom d'hidrogen, el protó, és el més utilitzat tant en els laboratoris de química orgànica com en els hospitals per a diagnòstic mèdic. En el nostre cas hem triat, però, el nucli de l'àtom de fluor. Es tracta d'un nucli molt sensible en experiments de RMN, que es troba molt rarament en els éssers vius; per això ens dóna selectivitat. Teresa Tarragó al nostre laboratori, partint d'un suggeriment inicial de l'investigador italià Claudio Dalvitt,<sup>12</sup> ha posat a punt un mètode que li ha permès trobar en plantes utilitzades en medicina tradicional xinesa inhibidors de dues proteases terapèuticament molt rellevants: la proliloligopeptidasa (POP) i la proteasa del virus VIH-1.<sup>13,14</sup> La POP és una diana terapèutica, no validada, per al tractament de l'esquizofrènia i

el trastorn bipolar. La proteasa del VIH és una de les principals dianes terapèutiques en el tractament de la SIDA. El mètode és molt senzill; primerament es prepara un substrat de l'enzim que conté àtoms de fluor. Quan l'enzim catalitza la reacció química, l'espectre de RMN de  $^{19}\text{F}$  del producte de partida desapareix i apareix l'espectre del producte de reacció. D'aquesta manera es pot veure de seguida si un extracte d'una planta conté o no un inhibidor de l'enzim. L'assaig és molt robust; tant se val que les plantes tinguin color, siguin fluorescents o que els extractes siguin molt complexos; el que no tenen és fluor i, per tant, l'assaig és totalment selectiu. D'aquesta manera, Teresa Tarragó va aïllar la berberina,<sup>15</sup> un alcaloide per al qual estem intentant endegar, en col·laboració amb el doctor Eduard Vieta de l'Hospital Clínic, assaigs clínics per al tractament del desordre bipolar. Nessim Kichik al nostre laboratori està sintetitzant alguns derivats de la berberina amb vista a millorar-ne les propietats farmacològiques.

L'angiogènesi —és a dir, formació de nous vasos sanguinis— és un procés molt important en processos tumorals. Les cèl·lules del tumor secreten el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF). Quan el VEGF arriba a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis provoquen el «brot» de nous vasos. Aquests nous vasos permeten l'alimentació i l'oxigenació del tumor, el seu creixement i, eventualment, faciliten la metastasi.<sup>16</sup>

En aquest cas es tracta de trobar inhibidors de la interacció del VEGF amb el seu receptor a la superfície de la cèl·lula de l'endoteli vascular. Ricard Rodríguez ha posat a punt un mètode basat, aquesta vegada, en RMN de C-13 per a trobar aquest tipus d'inhibidors. Es coneix l'estructura tridimensional del complex entre el VEGF i el seu receptor. En Ricard, actualment a la Harvard Medical School, durant la seva tesi es va adonar que els aminoàcids Met-18 i Met-81 estaven situats justament a la interfície entre el VEGF i el seu receptor. Va preparar una versió de VEGF marcada amb C-13 només en els cinc grups metil de les metionines de la proteïna. L'espectre de RMN, anomenat *HSQC* de la proteïna mostra només cinc senyals (figura 9). Per cert, que, en aquest cas, en comptes de síntesi química, és més senzill preparar la proteïna utilitzant *E. coli* i metionina sintètica marcada amb C-13. Si s'afegeix un compost químic capaç d'unir-se al VEGF i de fer-ho precisament a la zona on hi ha situades les metionines 18 i 81, ens trobarem que aquests dos senyals de RMN, i tan sols aquests dos senyals, es desplacen. Això és el que provoca l'addició d'un pèptid cíclic desenvolupat per l'empresa GENENTECH que fem servir com a control positiu. Això és el que fa també la baicalina, un flavonoide aïllat per en Ricard en analitzar el comportament davant del VEGF dels extractes de les 48 plantes de medicina tradicional xinesa de què disposem al laboratori.<sup>17</sup> Posteriorment, el doctor Peter Tremmel ha sintetitzat una gran quantitat de molècules inspirades en la baicalina, algunes de les quals presenten propietats molt prometedores.

Hem parlat de RMN de  $^{19}\text{F}$ , de  $^{13}\text{C}$ , etc. Podem utilitzar també RMN de  $^{15}\text{N}$ . Això és el que hem fet en el cas de la POP. La POP humana va ser clonada i expressada per primera vegada per Teresa Tarragó al nostre laboratori fa pocs anys.<sup>18</sup> L'espectre de RMN que s'obté en marcar tots els aminoàcids de la POP amb  $^{15}\text{N}$  és d'una complexitat

impracticable. En canvi, podem aconseguir un espectre molt més senzill utilitzant com a font de  $^{15}\text{N}$  l'indole. L'indole és el precursor metabòlic de l'aminoàcid triptòfan. La POP té dotze triptòfans. L'espectre ara conté només dotze senyals, un per cada triptòfan. Com he comentat anteriorment, creiem que si poguéssim inhibir la POP, això representaria un pas endavant important en el tractament de malalties com l'esquizofrènia o el trastorn bipolar. Amb aquesta eina a la mà, ara podem saber si un potencial inhibidor s'uneix a la proteïna per un punt determinat de la superfície, pel centre actiu, per la boca del túnel que duu al centre actiu, etc.

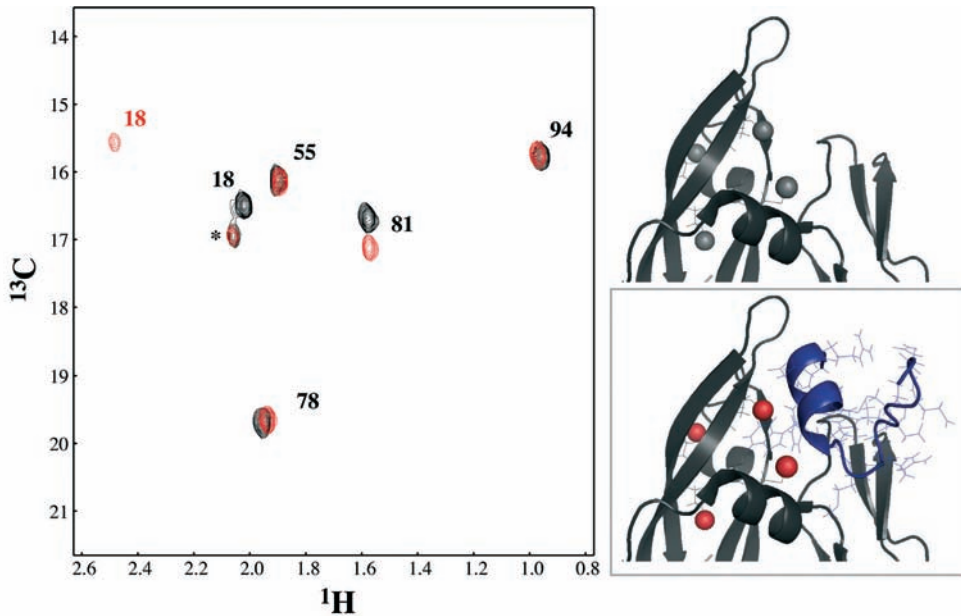


Fig. 9. Espectre de RMN, tipus HSQC, d'una mostra de VEGF marcada amb Met C-13 en absència de lligand (indicat en negre) i en presència de lligand (indicat en vermell).

## SALTANT TANQUES

Moltes de les proteïnes de les quals he parlat fins ara cal anar a trobar-les a l'interior de la cèl·lula, al citoplasma. És el cas de la P53 o de la POP, per exemple. La membrana plasmàtica actua com un mur que evita l'entrada de la major part de composts químics, especialment els que són molt hidròfils. Es per això, que aquests darrers anys el nostre laboratori s'ha especialitzat en el desenvolupament de pèptids «llançadora». Molècules que

són capaces de travessar la membrana portant enganxat el lligand que volem que s'uneixi a la proteïna diana. Es tracta en tots els casos de pèptids rics en prolina, dendrímers,<sup>19,20</sup> pèptids lineals, i  $\gamma$ pèptids.<sup>21</sup> De tota manera, per casualitat, hem vist que composts no peptídics que vam sintetitzar per a interaccionar amb P53 també són internalitzats i, concretament, van a parar als mitocondris.<sup>22</sup> Des d'un punt de vista pràctic, la molècula més prometedora és la que anomenem, en anglès, *sweet-arrow peptide* desenvolupat en col·laboració amb Dolors Ludevid.<sup>23,24</sup> Jimena Fernández-Carneado i Sílvia Pujals han demostrat que aquest pèptid no és gens citotòxic, que es pot preparar en versió amino-àcids D —totalment resistent a proteases— i que és capaç d'internalitzar, per exemple, nanopartícules d'or de 14 nm. Així, tenim cèl·lules tumorals —cèl·lules HeLa— que han entrat en contacte amb nanopartícules d'or decorades amb el *sweet-arrow peptide*; podem analitzar-les amb microscòpia confocal, amb microscòpia de raigs X —utilitzant el microscopi experimental del sincrotró de DESY a Berlín— o amb microscòpia electrònica, que ens permet visualitzar nanopartícules fent cua per entrar a la cèl·lula i d'altres que ja s'han internalitzat dins d'òrgànuls anomenats *coscos multivesiculars*.

La membrana plasmàtica és una bona barrera; una bona tanca. El cos humà és ple d'aquestes tanques i una de les més formidables, la més difícil de franquejar, és la barrera que separa la sang i el cervell: la «barrera hematoencefàlica». L'Alzheimer, l'esquizofrènia, el trastorn bipolar... totes són malalties del sistema nerviós central. Si volem desagregar la proteïna  $\beta$ -amiloide o volem inhibir la POP, els nostres composts han d'arribar al cervell. Aquí el camí que cal fer per a desenvolupar pèptids llançadora és molt llarg i tot just l'acabem de començar. Fa només pocs mesos, amb Meritxell Teixidó, hem descrit la primera generació de pèptids llançadora per a travessar la barrera hematoencefàlica. Es tracta de dipèptids cíclics.<sup>25</sup> Com a prova de concepte hem demostrat que són capaços de fer arribar al cervell molècules que, totes soles, no hi arriben, com ara la dopamina o la baicalina.

## CONCLUSIÓ

Resumint, els he parlat avui d'interaccions proteïna-proteïna i de disseny de lligands utilitzant mètodes més o menys artesanals, o més o menys automatitzats; de com podem combinar mètodes tradicionals de síntesi orgànica amb tècniques de química combinatòria o de biosíntesi per a produir una àmplia varietat de lligands i de proteïnes, i de com la RMN, juntament amb altres tècniques instrumentals, constitueix una eina potentíssima amb vista a estudiar la interacció lligand-proteïna. He intentat també posar aquests estudis en el seu context biològic, on el lligand es troba una sèrie de barreres que cal superar abans d'arribar a la proteïna diana.

Tot el que els he presentat avui és fruit d'una gran aventura col·lectiva, una aventura feta d'il·lusió, imaginació i treball; molt treball! Volia agrair l'esforç de tot el magnífic grup d'entusiastes col·laboradors que han dut a terme tots els experiments que acabo de comentar i, de manera molt especial, a les doctores Teresa Tarragó, Meritxell Teixidó i Natàlia Carulla, que, a més de tirar endavant les seves línies de recerca, assumeixen quotidianament al laboratori moltes responsabilitats, codirigint projectes, discutint resultats, aportant idees i crítiques, plantejant nous objectius, etc., etc. Tot això tampoc seria possible sense la dedicació i responsabilitat de la nostra gestora de projectes, la doctora Eva Poca. Em queda tan sols donar les gràcies a les fonts de finançament del nostre laboratori aquests darrers cinc anys i agrair-los a tots vostès la seva atenció.



## BIBLIOGRAFIA

1. C. Chiva, P. Barthe, A. Codina, M. Gairí, F. Molina, C. Granier, M. Pugniere, T. Inui, H. Nishi, Y. Nishiuchi, T. Kimura, S. Sakakibara, F. Albericio i E. Giralt. «Synthesis and NMR Structure of P41icf, a Potent Inhibitor of Human Cathepsin L». *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1508-1517 (2003).
2. M. L. Connolly. «Solvent-accessible surfaces of protein and nucleic acids». *Science*, **221**, 709-713 (1983).
3. E. Nicolás, C. Ferrer, L. Taboada i E. Giralt. «Coupe du Roi Bisection of Proteins. Spontaneous Tetramerization of Two Peptides That Span the Sequence of the Rabbit Uteroglobin Monomer». *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (50), 17719-17733 (2005).
4. J. J. Pastor, G. Granados, N. Carulla, F. Rabanal i E. Giralt. «Redesign of protein domains using one-bead-one compound combinatorial chemistry». *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14922-14932 (2007).
5. C. M. Dobson. «Getting out of phase». *Nature*, **418**, 729-730 (2002).
6. M. Arimon, I. Díez-Pérez, M. J. Kogan, N. Durany, E. Giralt, F. Sanz i X. Fernández-Busquets. «Fine structure study of Ab1-42fibrillogenesis with atomic force microscopy». *FASEB*, **19**, 1344-1346 (2005).
7. N. Carulla, G. L. Caddy, D. R. Hall, J. Zurdo, M. Gairí, M. Feliz, E. Giralt, C. V. Robinson i C. M. Dobson. «Molecular recycling within amyloid fibrils». *Nature*, **436**, 554-558 (2005).
8. D. Grillo-Bosch, N. Carulla, M. Cruz, L. Sánchez, S. Madurga, F. Rabanal i E. Giralt. «Retro-enantio peptides as  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitors» (2007) enviat a publicar.
9. G. M. Clore, J. Ernst, R. Clubb, J. G. Omichinski, W. M. Kennedy, K. Sakaguchi, E. Apella i A. M. Gronenborn. «Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor P53». *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 321-323 (1995).
10. I. Belda, S. Madurga, X. Llorà, M. Martinell, T. Tarragó, M. G. Piqueras, E. Nicolás i E. Giralt. «ENPDA: an evolutionary structure-based de novo peptide design algorithm». *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **3**, 1-17 (2005).
11. I. Belda, S. Madurga, T. Tarragó, X. Llorà i E. Giralt. «Evolutionary computation and multimodal search: A good combination to tackle molecular diversity in the field of peptide design». *Mol. Divers.*, **11**, 7-21 (2007).
12. C. Dalvit, E. Ardini, M. Flocco, G. P. Fogliatto, N. Mongelli i M. Veronesi. «A General NMR Method for Rapid, Efficient, and Reliable Biochemical Screening». *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14620-14625 (2003).

13. T. Tarragó, S. Frutos, R. A. Rodríguez-Mias i E. Giralt. «Identification of traditional Chinese medicinal plants with prolyl oligopeptidase inhibitory activity using  $^{19}\text{F}$ -NMR». *ChemBioChem*, **7**, 827-833 (2006).
14. S. Frutos, T. Tarragó i E. Giralt. A fast and robust  $^{19}\text{F}$ -NMR based method for finding new HIV-1 protease inhibitors». *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 2677-2681 (2006).
15. T. Tarragó, N. Kichik, J. Seguí i E. Giralt. «The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor». *ChemMedChem.*, **2**, 354-359 (2007).
16. N. Ferrara i R. S. Kerbel. «Angiogenesis as a therapeutic target». *Nature*, **438**, 967-974 (2005).
17. Ricard Rodríguez. Tesi doctoral. «NMR in Drug Discovery. From Screening to Structure-based Design of antitumoral agents». (2006).
18. T. Tarragó, E. Sabidó, M. J. Kogan, E. de Oliveira i E. Giralt. «Primary structure, recombinant expression and homology modelling of human brain prolyl oligopeptidase, an important therapeutic target in the treatment of neuropsychiatric diseases». *J. Pep. Sci.*, **11**, 283-287 (2005).
19. L. Crespo, G. Sanclimens, M. Pons, E. Giralt, M. Royo i F. Albericio. «Peptide and amide bond containing dendrimers». *Chem. Rev.*, **105**, 1663-1681 (2005).
20. L. Crespo, G. Sanclimens, B. Montaner, R. Pérez-Tomás, M. Royo, M. Pons, F. Albericio i E. Giralt. «Peptide Dendrimers Based on Polyproline Helices». *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8876-8883 (2002).
21. J. Farrera-Sinfreu, L. Zaccaro, D. Vidal, X. Salvatella, E. Giralt, M. Pons, F. Albericio i M. Royo. «A New Class of Foldamers Based on cis- $\gamma$ Amino-L-proline». *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6048-6057 (2004).
22. J. Fernández-Carneado, M. Van Gool, V. Martos, S. Castel, P. Prados, J. de Mendoza i E. Giralt. «A new class of highly efficient, non-peptidic oligoguanidinium vectors that selectively internalize into mitochondria». *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 869-874 (2005).
23. J. Fernández-Carneado, M. J. Kogan, S. Castel i E. Giralt. «Potential Peptide Carriers: Amphipathic Pro-rich peptides derived from the N-terminal domain of  $\gamma$ -zein as potential peptide carriers». *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 1811-1814 (2004).
24. S. Pujals, J. Fernández-Carneado, D. Ludevid i E. Giralt. «D-SAP: A new, non cytotoxic and fully protease resistant cell-penetrating peptide». *Chem.Med.Chem.* (2008) en premsa.
25. M. Teixidó, E. Zurita, M. Malakoutikhah, T. Tarragó i E. Giralt. «A novel family of Diketopiperazines as a Tool for the Study of Transport across the Blood-Brain Barrier (BBB) and Their Potential Use as BBB-Shuttles». *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(38), 11802-11813, (2007).

## RESUM

Les proteïnes són molècules cabdals per al correcte funcionament dels éssers vius, que actuen normalment en forma de xarxa. Sabem molt poc dels processos de reconeixement molecular que governen les interaccions proteïna-proteïna. Un dels mètodes utilitzats en el nostre laboratori per a aquests estudis és el de «trencar i enganxar», mètode que hem aplicat, per exemple, a l'estudi de l'uteroglobina o al disseny de nous dominis globulars relacionats amb la proteïna A.

El disseny de lligands capaços de reconèixer «retalls» predefinits de la superfície d'una proteïna té una gran importància en biomedicina, ja que, en el futur, hauria de permetre «modular» com es vulgui les interaccions proteïna-proteïna. Al nostre laboratori estem treballant en diversos sistemes de rellevància terapèutica: inhibidors d'agregació de la proteïna  $\beta$ -amiloide, «xaperones químiques» per a la P53, inhibidors d'angiogènesi basats en el reconeixement molecular del VEGF o inhibidors de la proliloligopeptidasa de cervell. El disseny d'aquests lligands s'enfronta amb la dificultat del nostre pobre coneixement, pel que fa a la quantitat, de les interaccions no covalents. No obstant això, hem desenvolupat noves metodologies que combinen el disseny automàtic *in silico* basat en algorismes evolutius amb la «validació» experimental, utilitzant una àmplia varietat de tècniques espectroscòpiques, entre les quals la ressonància magnètica nuclear (RMN) ocupa un lloc central.

Finalment, cal fer notar el paper important que tindran en el futur els pèptids «llançadora» que han de permetre que els lligands dissenyats i sintetitzats arribin a les seves proteïnes diana tot travessant les diverses barreres fisiològiques, com ara la membrana plasmàtica o la barrera hematoencefàlica.



## RESUMEN

Las proteínas son moléculas esenciales para el buen funcionamiento de los seres vivos, que actúan normalmente en forma de red. Sabemos muy poco sobre los procesos de reconocimiento molecular que gobiernan las interacciones proteína-proteína. Uno de los métodos utilizados en nuestro laboratorio para este tipo de estudios es el de «cortar y pegar», método que hemos aplicado, por ejemplo, al estudio de la uteroglobina o al diseño de nuevos dominios globulares relacionados con la proteína A.

El diseño de ligandos capaces de reconocer «parches» predefinidos de la superficie de una proteína cobra gran importancia en biomedicina, ya que, en el futuro, permitirá «modular» a voluntad interacciones proteína-proteína. En nuestro laboratorio estamos trabajando en distintos sistemas con relevancia terapéutica: inhibidores de la agregación de la proteína  $\beta$ -amiloide, «chaperonas químicas» para la P53, inhibidores de angiogénesis basados en el reconocimiento molecular de VEGF o inhibidores de la prolil oligopeptidasa de cerebro. El diseño de estos ligandos viene dificultado por nuestro pobre conocimiento, a nivel cuantitativo, de las interacciones no covalentes. Pese a ello, hemos desarrollado nuevas metodologías que combinan el diseño automático *in silico* basado en algoritmos evolutivos con la «validación» experimental, utilizando una amplia variedad de técnicas espectroscópicas, entre las cuáles la resonancia magnética nuclear (RMN) ocupa una posición central. Finalmente, hay que destacar el importante papel que jugarán en el futuro los péptidos «lanzadera», que permitirán que los nuevos ligandos sintéticos lleguen a sus proteínas diana atravesando las distintas barreras fisiológicas, como la membrana plasmática o la barrera hematoencefálica.



## ABSTRACT

The proteins are essential molecules of life that operates normally with a network structure.

We know very little about the molecular recognition processes that govern protein–protein interactions. One of the methods used in our laboratory for this type of studies is to «cut and paste», method that we have applied, for example, to the study of uteroglobin or to the redesign of globular domains related to protein A.

The design of ligands capable of recognizing predefined «patches» of the surface of a protein is of great importance in biomedicine since, in the future, will allow «modulating» to will protein–protein interactions. In our laboratory we are working on different systems with therapeutic relevancy: inhibitors of the aggregation of the  $\beta$ -amiloid protein, «chemical chaperones» for P53, angiogenesis inhibitors based on the molecular recognition of VEGF or human brain protil oligopeptidase inhibitors.

The design of these ligands is hampered by our poor knowledge, at quantitative level, of non-covalent interactions. In spite of this, we have developed new methodologies that combine the automatic design *in silico* based on evolutionary algorithms with experimental «validation» using a variety of spectroscopic techniques, especially nuclear magnetic ressonance (NMR). Finally, it is necessary to emphasize the important role that peptide «shuttles» will play in the future. These shuttles will allow that the new synthetic ligands to reach to their protein target overcoming different physiological barriers as the plasmatic membrane or the blood-brain barrier.



## DISCURS DE RESPOSTA PER L'ACADÈMIC NUMERARI

Excm. Sr. Dr. Josep Font i Cierco

Des que James Watson i Francis Crick van proposar l'any 1953 (amb l'ajut dels treballs de raigs X de Rosalind Franklin i Maurice Wilkins) una estructura de doble hèlix per a la molècula del DNA, el desenvolupament de la genòmica ha significat un dels avenços més importants de la segona meitat del segle xx. Que la informació genètica quedés gravada en un codi de només quatre lletres, les quatre bases púriques i pirimidíniques, va representar una revolució en la ciència biològica. Durant molts anys la recerca en biologia molecular, bioquímica i bioorgànica ha estat condicionada per aquest fet i ha produït una plèthora de coneixements al voltant del misteri unitari de la vida.

Les proteïnes, les macromolècules biològiques més abundants, encara que conegudes i reconegudes des de molts decennis enrere, han estat estudiades en aquest període amb menys intensitat: semblava que tot estava fet i que el més important era el DNA. Però, si els éssers vius som alguna cosa és gràcies a les nombroses funcions dels milers de proteïnes que hi ha en una simple cèl·lula. Necessitem el DNA per a transmetre a la nostra descendència la informació genètica que ens fa morfològicament iguals, però depenem de les proteïnes per ser el que som. És cert que la informació genètica s'expressa en forma de proteïnes, però també és cert que cada gen es pot expressar en diferents proteïnes, la qual cosa possibilita aquesta gran diversitat dels éssers vius dins un rerefons genòmic molt unitari. Genoma i proteoma són, doncs, dos pilars fonamentals de la biodiversitat.

A diferència del DNA, les proteïnes s'escriuen amb vint lletres, és a dir, amb els vint  $\alpha$ -aminoàcids naturals homòquinals de la sèrie L. Conèixer correctament l'estructura de les proteïnes ha esdevingut una de les tasques més feixugues de la recerca quimicobiològica. Han passat molts anys des del descobriment el 1806 d'un dels primers aminoàcids coneguts, l'asparagina, fins a determinar l'estructura seqüencial o primària, així com les estructures secundàries, terciàries i quaternàries de proteïnes com l'hemoglobina, la quimotripsina o el col·lagen.

Per això s'ha aplicat un potent camp visual adaptat sobretot a escala atòmica, l'estructura dels aminoàcids i la seva seqüenciació, és a dir, a observar la molècula com si fos una molècula orgànica clàssica, encara que molt més gran. La metodologia química de degradació (hidròlisi i separació) i de síntesi va contribuir a l'estudi de la seqüenciació dels aminoàcids (estructura primària). Tècniques físiques, especialment les de difracció de raigs X, van aportar dades crucials per a la determinació de l'arquitectura final d'una

proteïna i, fins i tot, per a estudiar l'assemblatge de subunitats (estructura quaternària).

A mesura que s'aplicava un camp visual menys enfocat, la proteïna adquiria unes formes macroscòpiques, amb plegaments, hèlixs, canals, forats, cavernes, panys, etc., decorats amb les restes o penjolls de cadascun dels aminoàcids, a partir dels quals hom podia assignar a la macromolècula funcions ben diferents, com les de suport estructural, moviments musculars, rotors, receptors, reconeixement molecular, selles catalítiques (enzims), etc., essencials per a les accions pròpies dels òrgans o aparells d'un ésser viu: membranes, esquelets, músculs, moviments, transmissió nerviosa, sentits, etc.

El doctor Ernest Giralt, a qui acabem de sentir en el seu discurs de recepció en aquesta Acadèmia, no solament ha viscut totes les fases del coneixement exhaustiu de les proteïnes, sinó que hi ha contribuït de manera molt important en totes.

El doctor Giralt va entrar en contacte amb la recerca a través de la química orgànica clàssica l'any 1971, sota la direcció del professor Ricard Granados, elaborant una tesi doctoral que defensà l'any 1974 sobre benzomorfans. Res a veure amb proteïnes. El doctor Granados va ser el continuador del doctor Josep Pascual i Vila en la càtedra de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona, després de guanyar-la en una renyida oposició, en què també participaren dos antics col·laboradors del doctor Pascual.

En aquells temps dues tècniques experimentals planejaven poderosament sobre la metodologia de treball en química orgànica: la ressonància magnètica nuclear (RMN), crucial per a la ràpida determinació estructural i conformacional dels compostos orgànics, i la síntesi en fase sòlida, que permetia el creixement o la construcció seqüencial de molècules orgàniques ancorades en suports polimèrics insolubles, minimitzant els esforços de purificació dels intermedis de síntesi. Probablement influenciat pel doctor Josep Castells, aleshores investigador científic en el CSIC i que conreava amb èxit aquestes dues tècniques, però també pel seu ímpetu, el doctor Giralt començà ben aviat a interessar-se i a publicar, com a autor únic o principal, treballs sobre estudis de RMN de substàncies orgàniques, especialment de tipus d'anàlisi conformacional i barreres de rotació. Una estada a Montpeller el va introduir en la metodologia sintètica de la fase sòlida per a la síntesi seqüencial o iterativa de pèptids. Aquests dos vessants, la RMN i les proteïnes, han estat el seu *leitmotiv* de treball al llarg de la seva vida recercadora i acadèmica.

La RMN ha evolucionat extraordinàriament des dels primers aparells de 60 MHz amb imant permanent, que van arribar a Barcelona a la meitat de la dècada dels seixanta. El doctor Giralt ha estat un dels científics que, en el nostre àmbit, més ha impulsat l'establiment d'aparells d'alta resolució (camps magnètics més intensos, superconductors, etc.) i, sobretot, ha introduït tècniques de treball que permeten l'elucidació estructural de grans molècules, com ara les proteïnes (RMN de carboni 13 i d'altres nuclis, espectres bidimensionals i multidimensionals, seqüències de polsos COSY, correlacions heteronuclears com ara HMBC i HMQC, correlacions de l'efecte nuclear Overhauser —nOe— com NOESY i ROESY, experiments de difusió, etc.). El Centre o Servei de RMN de la Universitat de

Barcelona, que dirigeix amb espectroscopis com el de 800 MHz, és un punt de referència nacional i estatal. No és en va, per tant, que l'any 2002 rebés el Premi RMN de la Real Sociedad Española de Química.

Avui hem pogut constatar com el doctor Giralt fa ús de la RMN, d'una manera magistral, per a estudiar i determinar el reconeixement molecular de superfícies proteiques, un problema cabdal per a poder entendre molts dels mecanismes bioquímics dels éssers vius i per a poder dissenyar, per exemple, nous medicaments.

La recerca del doctor Giralt es pot delinear en dos períodes, que tenen un cert grau de difusió o encavalcament. Podem observar un primer període, més dedicat a problemes sintètics, i una darrera fase, dedicada a pensar i estudiar aspectes de química supramolecular i de reconeixement molecular.

Una bona manera per a determinar i estudiar l'estructura i la funcionalitat d'una proteïna, igual com es fa amb altres molècules orgàniques, és sintetitzar-la. En aquest aspecte, el doctor Giralt hi ha esmerçat els seus millors esforços. Ja en els seus primers treballs trobem síntesi de pèptids biològicament prominents, com els dels factors hormonals hipotalàmics, o l'antamanida (decapèptid aïllat d'*Amanita phalloides*, que actua com a antitoxina d'un altre heptapèptid tòxic, la fal·loïdina), etc. Treballs que no es reduïren a copiar mimèticament la metodologia de la fase sòlida aplicada a la síntesi de pèptids i proteïnes inventada per qui va ser Premi Nobel de Química de 1984, Robert Bruce Merrifield, sinó que en millorà la tècnica introduint noves resines, nous grups protectors de les funcions amina o carboxil dels aminoàcids i noves desproteccions d'aquests grups protectors. Puc esmentar, per exemple, noves resines benzhidrilamíniques —com la PAB o la NBB— i l'ús de nous grups protectors —com l'Fmoc o el Phacm—, i la utilització del pal·ladi en la desprotecció de determinats grups protectors.

A més de resoldre aquests problemes de metodologia sintètica, molts dels seus primers treballs estan dedicats a estudis relacionats amb les formes tautomèriques de la histidina i amb pèptids que contenen l'aminoàcid cisteïna i/o el seu dímer cistina amb un pont de disulfur. Així, el 1989, ja va dissenyar la síntesi dels dímers paral·lel i antiparal·lel de pèptids de biscisteïna. O, més endavant, va sintetitzar pèptids no naturals palindròmics. D'aquest aspecte sintètic és digne de menció el seu article de revisió de 1993 a *Tetrahedron*, «Convergent solid-phase peptide synthesis».

Quan dic «dels seus primers treballs», em refereixo als seus primers cent articles publicats entre 1974 i 1990, ja que hem de pensar que, en el dia d'avui, el doctor Giralt te més de 300 articles publicats en revistes de gran rellevància (sense comptar actes i *proceedings* de congressos) com són *Nature*, *Journal of the American Chemical Society*, *Angewandte Chemie*, *Chemical Reviews*, *Journal of Organic Chemistry*, *ChemBioChem*, *Journal of Medicinal Chemistry*, *Journal of Peptide Science*, etc., etc.

L'interès pel reconeixement molecular que presenten les proteïnes ja el va reflectir ben aviat en un article a *Anales de Química*, de l'any 1993, i un altre a *Journal of the American*

*Chemical Society* del mateix any, en què descriu el primer exemple d'una nova família de pèptids del tipus biscisteïna amb propietats de reconeixement iònic. Des d'aleshores ha estudiat exhaustivament les funcions supramoleculares de les superfícies proteiques, des del seu laboratori al Parc Científic de la Universitat de Barcelona i en col·laboració amb altres grups de treball nacionals (com els de l'ICIQ) i internacionals. Temes com l'autoassemblatge en la formació de superfícies amfífiles i el reconeixement de superhèlixs aniòniques, la determinació estructural de la Kahalida (un agent anticancerós polipeptídic aïllat d'un organisme marí), l'ús d'interaccions catió- $\pi$  per a intensificar l'enllaç entre pèptids  $\alpha$ -helicoidals i molècules catióniques, les propietats supramoleculares del domini *N*-terminal de la  $\gamma$ -zeïna, dendrímers basats en poliprolina, l'ús de les tècniques més modernes de la RMN i de les tècniques computacionals en les interaccions de lligands a les superfícies proteiques, etc., han estat fites ben reconegudes per la comunitat científica mundial.

Tal com ha indicat avui l'acadèmic electe, la seva recerca no és solament de caràcter bàsic (pura, en dèiem abans) sinó que té implicacions pràctiques, especialment en la medicina, bé per a poder dissenyar nous fàrmacs en forma de molècules petites, bé per a poder obtenir vacunes emprant únicament els dominis o les parts dels antigens proteics que actuen específicament en el reconeixement molecular. Aquest darrer camp ha estat explorat pel doctor Giralt, per exemple per a obtenir potencials vacunes de la malaltia vírica de la febre aftosa (*foot-and-mouth disease*) que afecta al bestiar porcí i boví. No cal dir, després del seu discurs, que altres aplicacions mèdiques, com el tractament dels processos cancerosos o de la malaltia d'Alzheimer, podran ser tractades amb més probabilitats d'èxit si es coneixen amb detall els mecanismes de reconeixement molecular de les superfícies proteiques, tasca en la qual està implicat el doctor Giralt.

Un breu repàs al seu currículum ens dóna un perfil bastant acurat de la seva activitat professional. Es llicencià en Química, l'any 1970, per la Universitat de Barcelona i va treure el Diplôme d'Etudes Approfondies en Chimie Organique per la Universitat de Montpellier i el Doctorat en Química per la Universitat de Barcelona, l'any 1974. En aquesta última universitat és catedràtic de Química Orgànica des de 1986. Ha estat Visiting Professor a la Universitat de Califòrnia (San Diego) i Research Associate a l'Scripps Research Institute, a La Jolla (1990). És cap de grup del Programa de Química i Farmacologia Molecular del Parc Científic de la Universitat de Barcelona i responsable científic del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear del mateix Parc. Ha dirigit 21 tesis doctorals, ha publicat més de 300 articles en revistes internacionals de gran rellevància, quatre llibres, diversos articles de revisió i sis patents.

És membre fundador de la Societat Europea de Pèptids, editor del *Journal of Peptide Science* des de 1994 i és on ha estat membre del consell editorial de 10 revistes de gran prestigi internacional, com ara *ChemBioChem*, *Chemical Society Reviews*, *The American Peptide Society*, etc.

Ha rebut els premis i distincions següents: Medalla Narcís Monturiol de la Generalitat de Catalunya (1992), Leonidas Zervas (1994), Distinció de la Generalitat de Catalunya (2001),

Premi RMN de la RSEQ (2002) i Premi Nacional de Química de la RSEQ (2003). Ha estat membre de diferents comitès científics de diversos congressos nacionals i internacionals, i va ser *chairman* del XXI European Peptide Symposium, celebrat el 1990 a Platja d'Aro.

La personalitat del doctor Giralt no queda perfilada només esmentant la seva tasca investigadora. Ernest Giralt, com ens ha demostrat avui, és un magnífic comunicador, didàctic i pedagògic. Amb poques paraules ens dóna una gran informació, ens obre els ulls per a poder veure nítidament la problemàtica que ens exposa i ens presenta solucions adients. Les seves conferències i les seves classes —segons que em diuen els alumnes—, han estat sempre precises, però alhora divulgatives i a l'abast de qualsevol, encara que no se sigui expert en el tema.

D'una simpatia desbordant, encara té un altre aspecte que el fa més proper a un home multidisciplinari del Renaixement florentí que no pas a un científic submergit en la seva especialitat o immers en els seus problemes i absent de la cultura humanística. Un exemple fefaent és el seu domini de la flauta de bec amb la qual és capaç d'oferir encomiables concerts, ja sigui sol o formant part del grup *La dolça fusta*, en el qual intervé, entre d'altres, la seva esposa Dolors Ludevid, amb qui comparteix, també entre altres vivències més importants, la paternitat de diversos articles científics. Una altra faceta musical de l'Ernest és la seva participació al Grup de Cant Gregorià de l'Ateneu de Sant Just Desvern. Potser perquè sap que el treball en grup és cabdal per a l'avenç de la cultura i de la ciència, el seu reconeixement a la feina feta pels seus col·laboradors i col·laboradores n'ha estat avui un exemple paradigmàtic.

És per tot això que prego a l'Acadèmia de Ciències i Arts de Barcelona que vulgui admetre com a acadèmic numerari el professor Ernest Giralt, ja que estic segur que, amb el seu saber i la seva bonhomia, prestigiarà aquesta institució.

Amic Ernest, benvingut en aquesta casa, que d'ara endavant serà també la teva. I benvingut amb la confiança que les teves aportacions contribuiran a engrandir-la.

