

Síntesis y Caracterización de Kisspeptina10

Propuesta de Investigación

Andrés D. Macías G.

Programa de Medicina

Facultad de Ciencias de la Salud
amacias479

Julio C. Barón R.

Programa de Medicina

Facultad de Ciencias de la Salud
jbaron5

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Programa de Medicina

RESUMEN

A lo largo de esta última década, la comprensión de la señalización de los GPCR se amplió con la descripción de agonistas tendenciosos (Biased Agonists), llamados así porque son capaces de activar preferentemente una vía de señalización sobre otra, es decir, entre la activación de proteína G o β -arrestins. Antes que todo, para realizar la síntesis de análogos de Kp10, la primera etapa de investigación es la contemplada en el actual Proyecto. Esta etapa consiste en la síntesis y caracterización de Kp10, a través de ensayos BRET. Luego, calcularemos el factor de tendencia. Finalmente, con la información obtenida con Kp10 haremos los correspondientes análogos, para así evaluar posteriormente la señalización de este sistema en diferentes tipos de cancer.

ABSTRACT

Throughout this last decade, the understanding of the signaling of GPCRs was extended with the description of biased agonists, so called because they are capable of preferentially activating one signaling pathway over another, that is, between proteinactivation G or β -arrestins. Before, to the synthesis of Kp10 analogs, the first stage of this project is the synthesis and characterization of Kp10, through BRET assays. Then, we will calculate de biased factor. Finally, with the information obtain with the Kp10 we will make the Kp10 analogs tu evaluate the contirbution of this system in cancer.

Área de Conocimiento

Ciencias de la Salud - Farmacología

Palabras Clave

Kisspeptina, GPCRs, Agonismo Tendencioso, Cáncer, Metastasis.

INTRODUCCIÓN

Existen principalmente dos mecanismos de señalización en los que se encuentra involucrado el sistema kisspeptina.

Movilización de calcio a través de activación de G_q :

Los niveles de Ca^{2+} intracelular se presentan significativamente aumentados cuando han sido transfectadas células B16 de melanoma, CHO y HEK293 con el receptor GPR54 y posteriormente tratadas con kisspeptinas. KissR es principalmente acoplado a $G_{q/11}$ en vez de a proteínas G_i o G_s . A través de la señalización mediada por $G_{q/11}$, la fosfolipasa $C\beta$ es activada (PLC β), generando dos segundos mensajeros los cuales

son IP_3 y DAG, los cuales conllevan a la posterior movilización de Ca^{2+} y activación de PKC respectivamente. Este aumento del calcio intracelular suprime marcadamente la metástasis de tumores e induce diferenciación y apoptosis de células humanas de cáncer. Además, la capacidad de formación de colonias de células de cáncer de mama (MDA-MB-435) se ha visto negativamente correlacionada con la expresión del receptor KissR.

Activación de Metaloproteinasas de Matrix Extracelular (MMPs): MMPs pueden degradar la matrix extracelular y jugar papeles dominantes en los procesos de metástasis tumorales. MMP-9 es la metaloproteinasa más conocida por su importante papel en la metástasis, esta proteína es capaz de de degradar la estructura primaria de la matrix extracelular y el soporte de la membrana (colágeno, laminina, fibronectina) y de esta manera promover la metástasis. Yan y colaboradores, mostraron que existe una marcada reducción en la invasión por parte de células HT-1080 en las cuales fue reducida la transcripción y la actividad de MMP-9, siguiendo así una marcada sobre-expresión de KissR. Esta reducción se cree es en parte a la disminución de p65 y p50 proteínas que activan el factor NF- κ B las cuales interaccionan con el promotor MMP. En resumen, la disminución en la síntesis y/o actividad de MMP9 induce efectos inhibitorios en la movilidad e invasión de células cancerígenas.

Es importante saber que estos procesos fisiopatológicos en los que se encuentra involucrado el Sistema kisspeptina son de alta importancia biológica. Este sistema ha sido escogido como modelo de estudio ya que no ha sido descrita de manera amplia y certera la señalización de dicho receptor.

JUSTIFICACIÓN

Creemos que el desarrollo de este proyecto es de grande importancia, ya que traerá nuevas informaciones sobre la contribución específica de las diferentes vías de señalización mediadas por el receptor KissR para la progresión ó retardamiento del desarrollo tumoral. Estas informaciones, además de ser relevantes desde el punto de vista del mecanismo de señalización y acción, también pueden contribuir para el desarrollo de futuros fármacos direccionados al receptor KissR.

OBJETIVOS

General

- Sintetizar y caracterizar farmacológicamente la Kp10.

Específicos

- Sintetizar por fase sólida el péptido Kp10
- Realizar ensayos de BRET para activación de proteína G
- Realizar ensayos de BRET para reclutamiento de β -arrestinas

METODOLOGÍA

Síntesis de péptidos en fase sólida

Será utilizado el método F-moc para la síntesis de la Kp10

Ensayos BRET para activación de Proteína G

Serán utilizados los biosensores $G\alpha$ -RLucII y $G\gamma$ -GFP10 para la caracterización de la señalización de KissR.

Ensayos de BRET para reclutamiento de β -arrestinas

Serán utilizados los biosensores KissR-YFP y β -arr-RLucII para la caracterización de la señalización de KissR.

RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados esperados con el presente proyecto permitirán caracterizar la señalización del péptido Kp10 en su receptor asociado. De esta manera, tendremos los correspondientes controles para la posterior síntesis de análogos de Kp.

CRONOGRAMA

Meses						
Actividad	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
Rev. Literatura						
Síntesis Kp						
BRET Gq						
BRET β						
Análisis de Resultados						
Escritura de manuscritos						

REFERENCIAS

LEFKOWITZ, R. J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. **J Biol Chem**, v. 273, n. 30, p. 18677-80, Jul 24 1998. ISSN 0021-9258 (Print)

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. **J Am Chem Soc**, v. 85, n. 14, p. 2149-&, 1963. ISSN 0002-7863. Disponible em: <<Go to ISI>://A19633101B00025 >.

KOTANI, M. et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **J Biol Chem**, v. 276, n. 37, p. 34631-6, Sep 14 2001. ISSN 0021-9258 (Print).