

## **CAPÍTOL 3**



## AVALUACIÓ

---

En el capítol 2 es descriu el procediment utilitzat per trobar un lligand peptídic capaç de reconèixer el domini de tetramerització de la p53. L'avaluació d'aquesta interacció però, ha estat de caràcter preliminar i ha estat necessari explorar altres metodologies per tal de poder caracteritzar detalladament aquest procés de reconeixement. A més a més, de cara a una futura avaluació d'un nombre relativament elevat de lligands també ha estat necessari establir alguna metodologia que permeti avaluar un gran nombre de pèptids amb la màxima fiabilitat i amb el menor temps possible.

Per tal de complir aquests objectius, s'han utilitzat diverses tècniques les quals tenen diferents requeriments pel que fa a la quantitat i tipus de mostra. En la taula 3.1, hi ha un resum de les tècniques explorades i dels requeriments de les mostres. Com es pot veure hi ha tècniques en les que és necessari el marcatge de la proteïna o el lligand, en d'altres s'ha d'immobilitzar en un suport sòlid algun dels dos components i en d'altres les quantitats necessàries de lligand o proteïna són molt elevades. En aquest sentit, totes aquestes tècniques poden ser útils per caracteritzar més profundament la interacció entre el Candidat 4 i la p53\_tetS, però no totes són viables per avaluar una quimioteca de diferents lligands.

	[ <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N]-HSQC	STD i trNOE	Fluorescència	RPS	ITC
Marcatge de la proteïna	Sí ( <sup>15</sup> N)	No	No	No	No
Marcatge del lligand	No	No	Sí (Trp)	No	No
Immobilització en suport sòlid	No	No	No	Sí	No
Quantitats (ligand / proteïna)	Alta / alta	Alta / baixa	Baixa / baixa	Baixa / baixa	Alta / alta

**Taula 3.1** Resum de les tècniques utilitzades per avaluar la interacció del Candidat 4 amb la p53\_tetS i les condicions que requereixen cadascuna d'elles.

A continuació hi ha descrit el treball realitzat amb cadascuna d'aquestes tècniques.

### 3.1 RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

En els darrers anys la ressonància magnètica nuclear s'ha establert com una de les tècniques més atractives per tal d'avaluar interaccions proteïna-ligand gràcies a les metodologies que s'han anat desenvolupant. La RMN té el gran avantatge que al mateix temps que dona informació de l'afinitat pot donar informació estructural molt valuosa de cara a entendre el procés de reconeixement i així poder dissenyar nous lligands. Principalment hi ha dues aproximacions experimentals, les quals són complementàries i tenen diferents avantatges. D'una banda, es poden utilitzar les variacions dels senyals dels àtoms de la proteïna i de l'altra es poden utilitzar les variacions dels senyals del lligand<sup>110</sup>.

Les metodologies basades en variacions dels senyals de la proteïna permeten obtenir informació estructural de la zona d'unió de la proteïna al mateix temps que permeten detectar les interaccions no específiques. A més a més, tenen l'avantatge que es poden utilitzar en pràcticament tot el rang d'afinitats. Per contra amb aquestes metodologies normalment s'utilitza la proteïna marcada amb <sup>15</sup>N i a vegades també amb <sup>13</sup>C, de manera que és necessari disposar d'algun mètode d'obtenció de grans

<sup>110</sup> Salvatella, X. & Giralt, E., *Chem. Soc. Rev.*, (2003), **32**, 635-372

Coles, M., Heller, M. & Kessler, H., *Drug Discovery Today.*, (2003), **8**, 803-810

quantitats de proteïna marcada. Per últim, amb aquestes metodologies hi ha un límit en el tamany de la proteïna que es pot estudiar, el qual avui en dia oscil·la entre els 45 i 70KDa.

Pel que fa a les metodologies basades en els senyals del lligand, aquestes normalment no presenten limitacions en el tamany de la proteïna que es pot estudiar i tampoc és necessari disposar de la proteïna marcada isotòpicament. A més a més, amb aquestes metodologies també es pot obtenir informació de quin és l'epítip del lligand, és a dir, quina és la part que interacciona amb la proteïna, i informació de quina és la conformació i orientació del lligand quan s'uneix a la proteïna. Tenen el problema, però, que en alguns casos poden donar falsos positius i que, en general, només són útils per a estudiar sistemes de moderada o baixa afinitat ( $K_D \approx 10^{-3}$ - $10^{-7}$ ). Es per això que aquestes metodologies normalment s'utilitzen per fer una primera avaluació de la interacció, tot i que també s'han utilitzat àmpliament per avaluar mesclades de productes.

### 3.1.1 EXPERIMENTS BASATS EN ELS SENYALS DE LA PROTEÏNA

En el moment en el qual es produeix la interacció entre el lligand i la proteïna en principi, es produeix una variació en els desplaçaments químics dels nuclis de tant la proteïna com del lligand. Des del punt de vista de la proteïna, els nuclis situats en la zona d'unió són els que es veuen més afectats. En teoria, a partir dels resultats d'un experiment tipus TOCSY es podria avaluar la variació en el desplaçament de cada protó, però a la pràctica, per a una proteïna és quasi impossible diferenciar entre tots els protons degut al solapament dels diferents senyals. Per solucionar aquest problema, normalment s'utilitzen proteïnes amb marcatge de  $^{15}\text{N}$ , ja que en un espectre bidimensional de  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC només s'hi observen els pics de correlació de cadascun dels NH de la proteïna. Així doncs, s'aconsegueix reduir moltíssim la quantitat de senyals de l'espectre i es pot identificar un senyal per a cada residu de la seqüència. En afegir-hi un lligand, a partir de la variació en el desplaçament d'aquests senyals es pot determinar tant l'afinitat com la regió de la proteïna amb la qual interacciona el lligand, ja que els desplaçaments dels residus d'aquesta regió són els que experimenten més perturbacions.

Mitjançant experiments de  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC es pot arribar a avaluar la interacció amb proteïnes de fins uns 30KDa. A partir d'aquest tamany comencen a sorgir problemes tant pel que fa al solapament dels pics com pel que fa a la sensibilitat dels senyals degut a la relaxació. Per tal de superar aquesta limitació en el tamany de la proteïna, avui en dia existeixen diferents metodologies (marcatge amb  $^2\text{H}$ , TROSY, CRIPT) que han permès estudiar proteïnes de més de 100KDa<sup>111</sup>. Una altra alternativa a aquestes limitacions és la utilització de marcatges selectius. Per exemple, mitjançant la utilització de medis de cultiu amb els precursors adequats es poden obtenir proteïnes amb els metils de valina, leucina i

---

<sup>111</sup> Fiaux, J., Bertelsen, E.B., Horwich, A.L. & Wüthrich, K., *Nature*, (2002), **418**, 207-211

isoleucina marcats amb  $^{13}\text{C}$ <sup>112</sup>, fet que disminueix enormement el nombre de senyals d'un espectre [ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ]-HSQC. Aquesta alternativa també té l'avantatge d'oferir una molt bona relació senyal-soroll, gràcies d'una banda a la presència de tres protons en el grup metil, i de l'altra a unes propietats de relaxació del grup metil en comparació amb el grup NH molt favorables. Tot plegat, ha permès treballar amb proteïnes de més de 70KDa. A més a més, en la major part del centres actius enzimàtics hi ha almenys un d'aquests tres residus, de manera que aquesta és una alternativa molt interessant en l'estudi de lligands dirigits als centres actius dels enzims. Una altra aproximació similar la trobem en la preparació de proteïnes amb marcatge selectiu de  $^{19}\text{F}$  o  $^{13}\text{C}$  en el Trp, fet que es pot aconseguir també utilitzant el medis de cultiu adequats<sup>113</sup>. Per últim, també s'ha desenvolupat la metodologia SEA-TROSY, la qual permet detectar només els grups NH exposats al dissolvent, reduint així el nombre de senyals<sup>114</sup>.

Tenint en compte el tamany de la p53\_tetS (26KDa aprox.) i el fet que es disposa d'una metodologia eficaç d'obtenció de la proteïna amb marcatge isotòpic, s'ha estudiat la interacció del Candidat 4 amb la p53\_tetS- $^{15}\text{N}$  a partir de les variacions en el desplaçaments dels protons amida de l'esquelet observades mitjançant espectres [ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ]-HSQC. S'ha de tenir en compte que tot i ser una proteïna de 26KDa, la p53\_tetS, en ser un homotetràmer amb simetria  $D_2$  els quatre monòmers són equivalents i només s'observen els 57 senyals corresponents als residus del monòmer.

### 3.1.1.1 [ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ]-HSQC

Si el pic de correlació d'un NH de la proteïna té un desplaçament diferent en la forma lliure i en la forma enllaçada, en el moment d'afegir el lligand es poden donar dues situacions extremes en funció del tipus d'intercanvi que es produeixi (figura 3.1). Si tenim una situació d'intercanvi ràpid entre la forma lliure i l'enllaçada, en afegir el lligand la posició del pic de correlació es desplaça a una posició promig en funció del percentatge de cada forma present en la solució. Per contra, si es té una situació d'intercanvi lent, s'observen simultàniament els pics corresponents a les dues formes presents en la solució amb una intensitat proporcional al percentatge present de cadascuna. En els casos intermedis, la situació no és tan clara i es pot observar l'eixamplament o desaparició de senyals<sup>115</sup>.

---

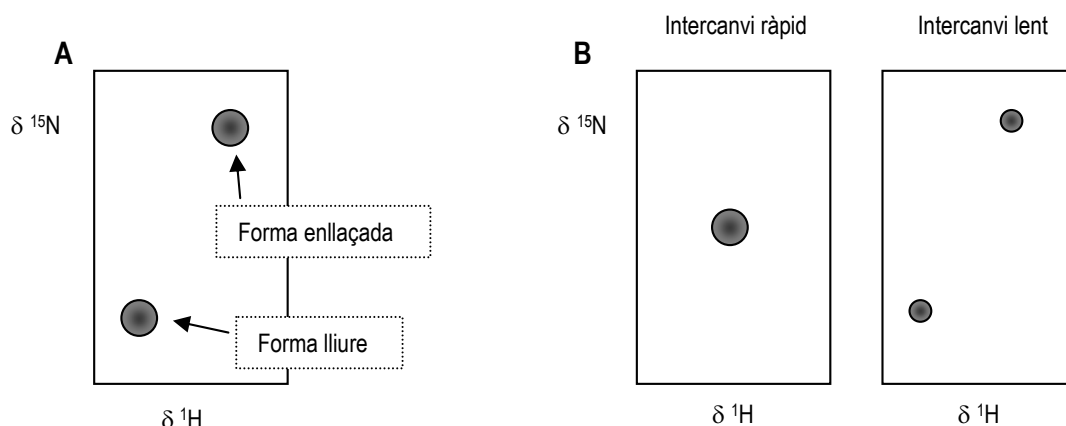
<sup>112</sup> Hajduk, P.J., Augeri, D.J., Mack, J., Mendoza, R., Yang, J., Betz, S.F. & Fesik, S.W., *J. Am. Chem. Soc.*, (2000), **122**, 7898-7904

<sup>113</sup> Rodríguez-Mías, R.A. & Pallecchia, M., *J. Am. Chem. Soc.*, (2003), **125**, 2892-2893

Leone, M., Rodríguez-Mías, R.A. & Pallecchia, M., *ChemBioChem*, (2003), **4**, 649-650

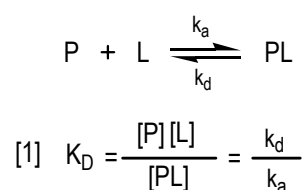
<sup>114</sup> Pallecchia, M., Meininger, D., Schen, A.L., Jack, R., Kasper C.B. & Sem, D.S., *J. Am. Chem. Soc.*, (2001), **123**, 4633-4634

<sup>115</sup> Stockman, B.J., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, (1998), **33**, 109-151



**Figura 3.1** Representació esquemàtica de les dues situacions. **A** – Representació dels senyals de la forma lliure i de la forma enllaçada. **B** – Representació, en funció del tipus d'intercanvi, dels senyals que s'observarien en una situació en la qual el 50% de la proteïna està complexada.

S'ha de tenir en compte que la definició de intercanvi ràpid o intercanvi lent en l'escala de temps de la RMN per aquest tipus d'experiment depèn bàsicament de dos paràmetres. D'una banda depèn de la  $k_d$  [1] i de l'altra de la diferència de desplaçament ( $\Delta\delta$ ) que hi ha entre la forma lliure i la forma enllaçada.



Així en els casos que la  $k_d$  és molt més gran que la diferència de desplaçament (en Hz), es té una situació d'intercanvi ràpid. En l'altre extrem, si la  $k_d$  és molt més petita, és té una situació d'intercanvi lent<sup>116</sup>.

En aquest treball s'ha avaluat la interacció esmentada mitjançant  $[\text{H-}^{15}\text{N}]$ -HSQC en tampó fosfat 25mM a pH7. En aquesta situació s'han observat pocs canvis, i per això s'ha decidit dur a terme una altra avaluació en aigua a pH 7, ja que una menor força iònica pot afavorir la interacció electrostàtica.

En ambdós casos s'ha treballat a 25°C i s'ha utilitzat l'assignació realitzada en el grup<sup>117</sup> i la descrita anteriorment en la literatura<sup>118</sup> (figura 3.2).

<sup>116</sup> Meyer, B. & Peters, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2003), **42**, 864-890

<sup>117</sup> Salvatella, X., Tesi doctoral, (2002), Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona

<sup>118</sup> Lee, W., Harvey, T.S., Yin, Y., Yau, P., Litchfield, D. & Arrowsmith, C.H., *Nat. Struct. Biol.*, (1994), **1**, 877-890

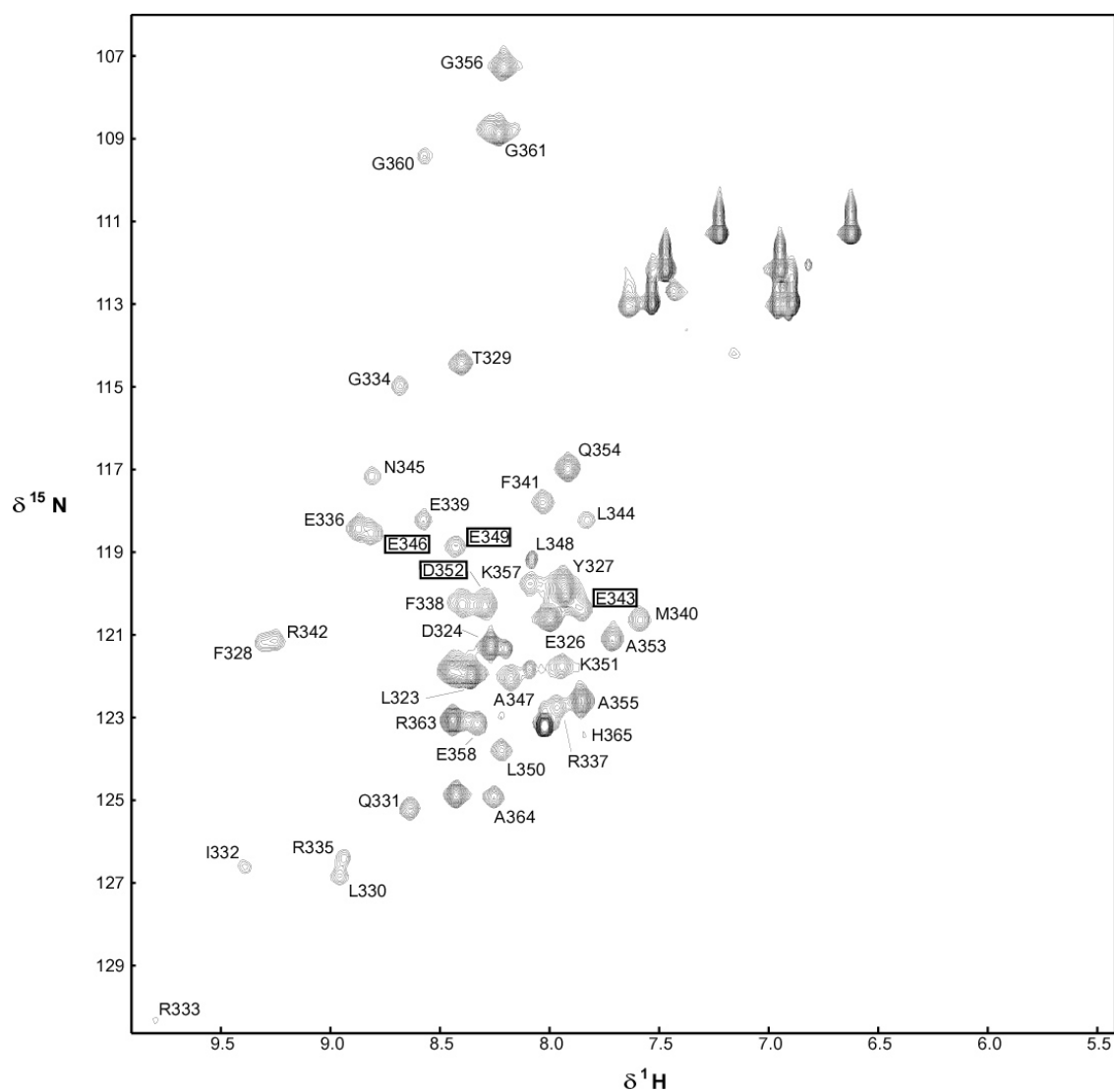


Figura 3.2 Assignació dels senyals de l'espectre  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC utilitzada en aquest estudi

### HSQC- $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ en tampó fosfat 25mM pH7

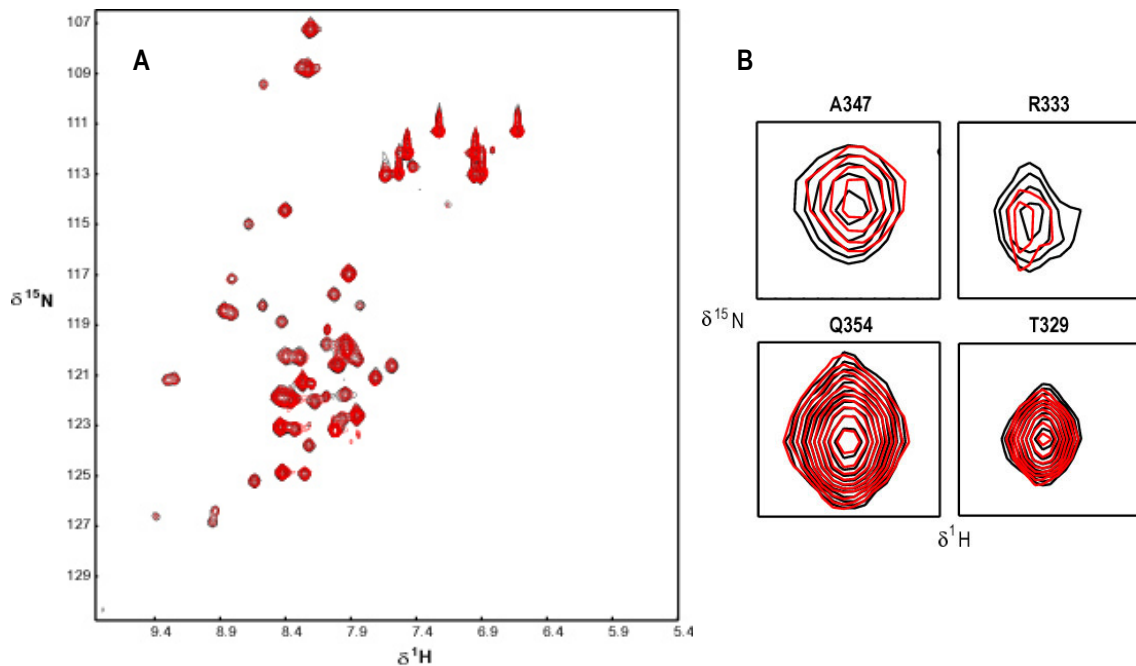
Per dur a terme la valoració, s'han enregistrat els espectres  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC de la p53\_tetS amb concentracions creixents del pèptid Candidat 4. S'han enregistrat els espectres corresponents a 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 i 8 equivalents de pèptid.

Per assegurar la màxima reproduïbilitat, per fer la valoració sempre s'ha utilitzat la mateixa mostra de p53\_tetS i s'hi ha anat afegint petits volums d'una solució concentrada de pèptid.

En general, no s'han observat grans canvis en la posició dels senyals. Tot i això, sí que s'han pogut observar lleugeres variacions en els desplaçaments químics d'alguns senyals de l'espectre, mentre que la resta de senyals s'ha mantingut exactament iguals al llarg de la valoració (figura 3.3). En alguns



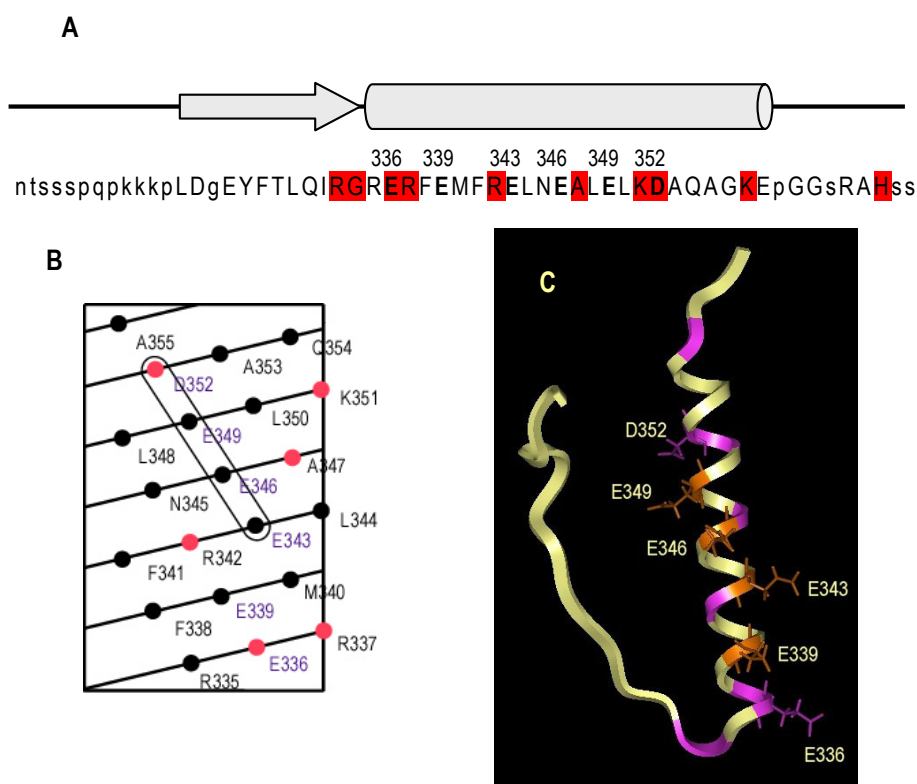
casos, també s'ha observat una lleugera disminució d'intensitat, però és possible que aquesta es degui a la lleugera dilució causada per l'addició de petits volums de solució amb pèptid.



**Figura 3.3** **A** – Superposició dels espectres  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC de la p53\_tetS en absència i en presència de 8 equivalents de Candidat 4. **B** – Ampliació d'alguns exemples representatius de senyals que han variat lleugerament el seu desplaçament químic i de senyals que no han variat gens durant la valoració.

Les variacions de desplaçament químic observades en el transcurs de la valoració són massa petites per poder fer una anàlisi quantitativa a partir de la qual obtenir la constant d'afinitat. Qualitativament, però, sí que semblen indicar que es produeix una interacció entre el Candidat 4 i la p53\_tetS. Tot i això, veient les petites variacions que es produeixen, sembla que la interacció és força feble o bé que la complexació provoca poques variacions en els desplaçaments químic.

Si es comprova quins són els residus més afectats durant la valoració, es pot veure que efectivament són els de la zona on hi ha situat els residus àcids E336, E339, E343, E346, E349 i D352, corresponents als dos motius tetraaniònics prèviament esmentats (figura 3.4). Aquest fet, confirma que el pèptid reconeix selectivament la zona de la p53\_tetS rica en residus àcids.



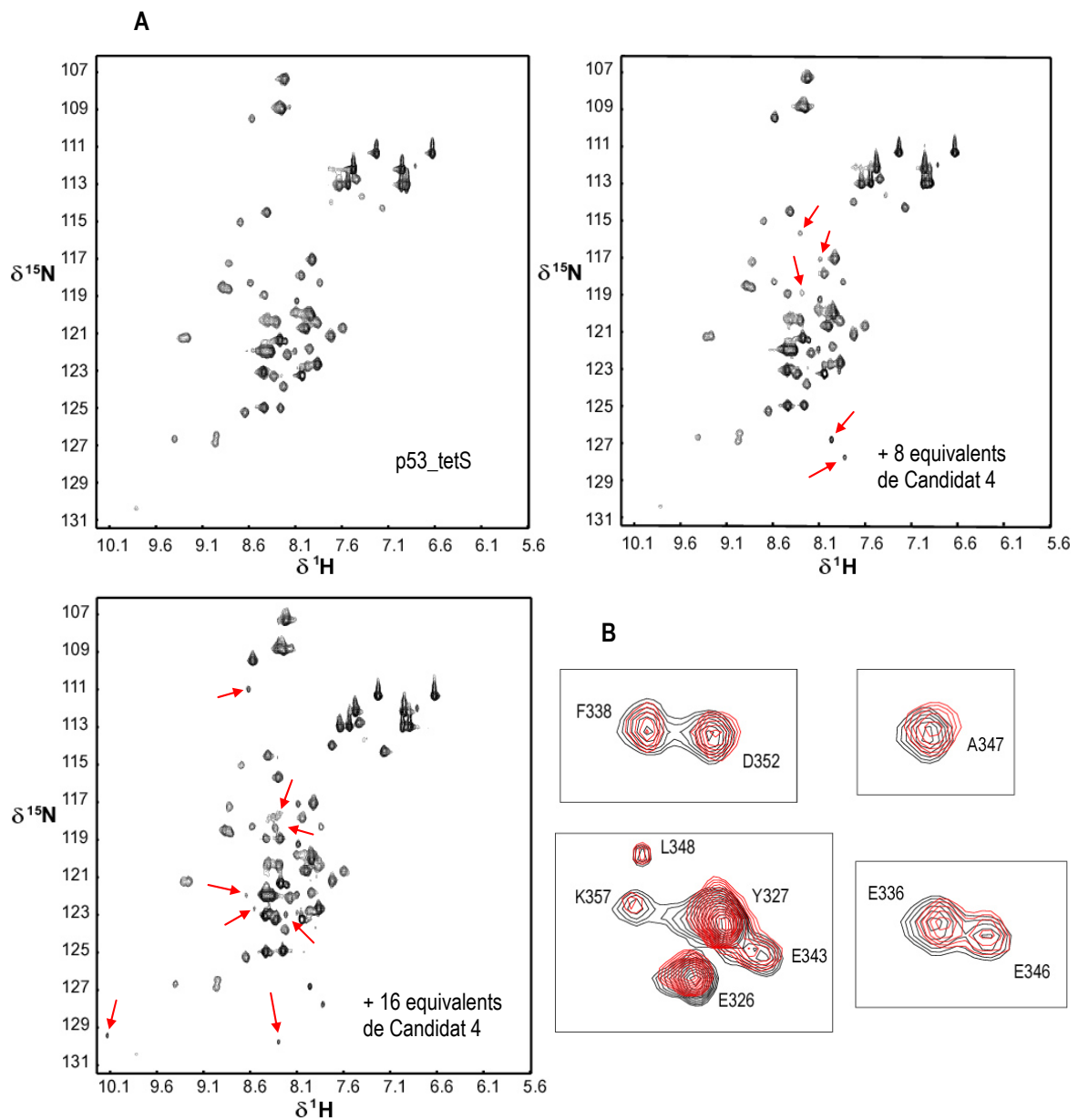
**Figura 3.4** Representació dels residus més afectats en l'espectre  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC de la p53\_tetS en la valoració amb el pèptid Candidat 4 en tampó fosfat 25mM pH 7. **A** – Representació en funció de l'estructura primària (els residus en minúscula no estan assignats i en vermell s'indiquen els residus més afectats). **B** – Representació en funció de la posició en l'hèlix (en vermell s'indiquen els residus més afectats). **C** – Representació tridimensional d'un dels monòmers de la p53\_tetS. En lila s'indiquen els residus més afectats i en taronja la resta de residus àcids de la zona.

### HSQC- $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ en aigua pH7

En aquest cas, per dur a terme la valoració, s'han enregistrat els espectres  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC de la p53\_tetS amb concentracions creixents del pèptid Candidat 4 corresponents a 0; 1; 2; 4; 8; i 16 equivalents.

A diferència del que s'ha observat en la valoració en tampó fosfat, en aquest cas a mesura que es va afegint el pèptid van apareixent nous senyals en l'espectre. És altament improbable que aquests senyals provinquin d'una impuresa, ja que aquesta hauria d'estar marcada amb  $^{15}\text{N}$ . Així doncs, això fa pensar que per alguns pics de correlació, en aquestes condicions d'anàlisi es té una situació d'intercanvi lent (figura 3.5). De fet, també s'observa una notable disminució de la intensitat d'alguns senyals de l'espectre. A més a més, hi ha d'altres senyals pels quals s'observa també una lleugera variació del seu desplaçament químic, suggerint així una situació d'intercanvi ràpid. La presència de senyals en una situació d'intercanvi ràpid amb senyals en situació d'intercanvi lent no és incompatible en un mateix

complex, ja que s'ha de tenir en compte que la definició d'intercanvi ràpid o lent, depèn de la  $k_{off}$  i de la diferència entre els desplaçaments químics entre la forma lliure i la forma complexada.



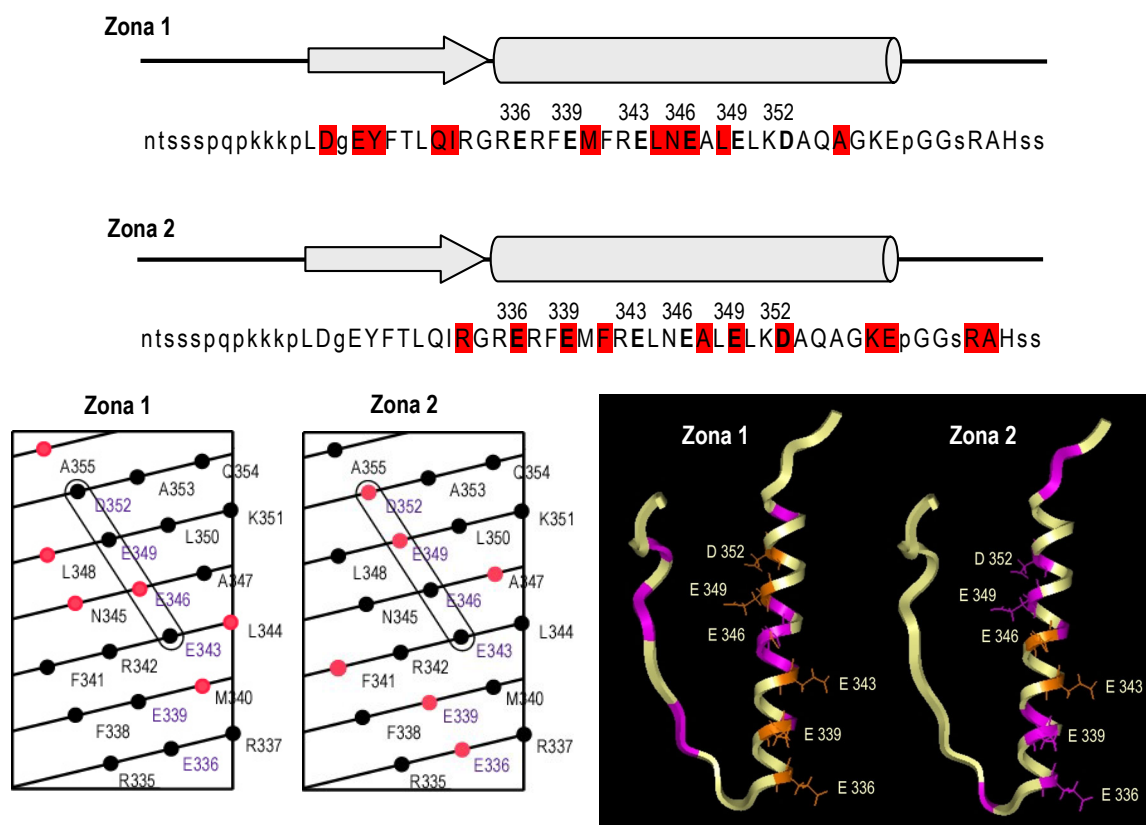
**Figura 3.5 A-** Evolució de l'espectre  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC d'una mostra de p53\_tetS amb concentracions creixents de Candidat 4 en aigua a pH 7. Les fletxes indiquen els nous senyals que han anat apareixent en l'espectre. **B-** Ampliació d'algunes zones representatives de l'espectre. En negre correspon a l'espectre sense Candidat 4 i en vermell a l'espectre amb 16 equivalents de Candidat 4.

Aquest resultat clarament confirma que el pèptid Candidat 4 interacciona amb la p53\_tetS.

Una anàlisi més detallada dels diferents senyals de l'espectre, permet observar que durant la valoració aquests varien de forma diferent entre ells. De la mateixa manera que en la valoració en tampó fosfat, s'ha fet una valoració addicionant fins a 8 equivalents de pèptid Candidat 4. En aquest cas, però,

s'ha seguit addicionant pèptid fins arribar als 16 equivalents. Així, en general, es poden diferenciar tres tipus de senyals: uns els quals varien amb els primers equivalents de pèptid i que després es mantenen constants, uns altres que varien durant tota la valoració o que només ho fan a partir dels 8 equivalents de pèptid, i uns tercers els quals no varien gens. A més a més, alguns senyals que apareixen amb els primers equivalents de pèptid, posteriorment experimenten lleugeres variacions en els desplaçaments químics.

Aquest comportament sembla indicar que en la superfície de la p53\_tetS hi ha diferents zones d'unió no equivalents entre elles. Per obtenir una idea clara de quantes zones hi ha i de quin són els residus involucrats en cada zona, s'hauria de fer una altra valoració amb molts més punts. De tota manera, amb les dades obtingudes es poden intuir dues zones: una zona d'elevada afinitat (residus que varien tan sols entre els 0 i el 8 equivalents de pèptid) i una altra de baixa afinitat (residus que varien durant tota la valoració o que només ho fan a partir del 8 equivalents) (figura 3.6). En aquest cas, també s'han senyalat els residus en els quals s'ha observat una clara disminució de la intensitat del seu pic de correlació, ja que segurament aquests seran els residus que correspondran als nous senyals.



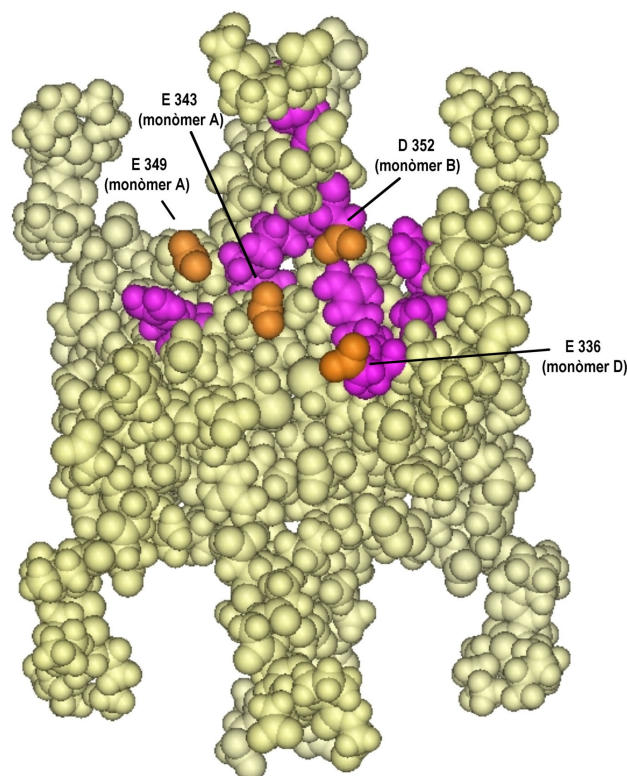
**Figura 3.6** Representacions equivalents a les de la figura 3.4 però diferenciant entre la zona d'elevada afinitat (zona 1) i la zona de baixa afinitat (zona 2).

De fet, es pot veure que pràcticament les dues zones se solapen i en ambdós casos estan envoltant els residus àcids E336, E339, E343, E346, E349 i D352.

### 3.1.1.2 Conclusió

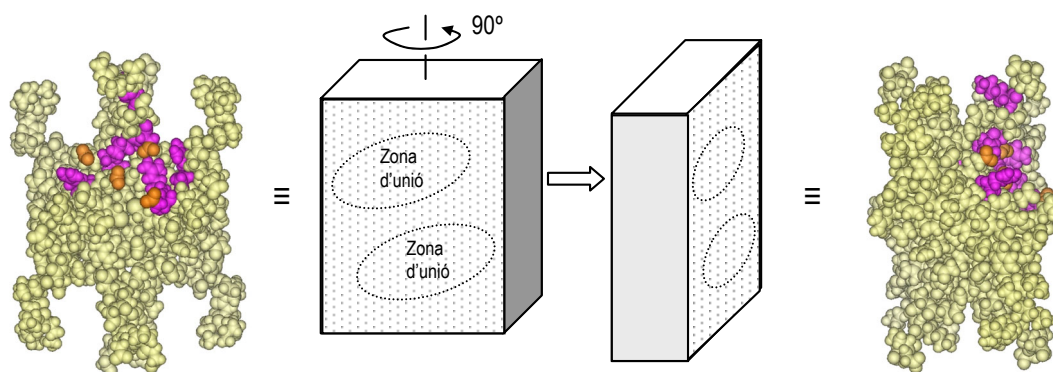
A partir dels experiments  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC tant en aigua com en tampó fosfat, queda clar que el pèptid Candidat 4 reconeix la zona de la superfície de la p53\_tetS rica en residus àcids. Per veure però, amb quines zones del tetràmer interacciona el pèptid, no és suficient fer una anàlisi de quins són els residus del monòmer més afectats sinó que cal fer una anàlisi tridimensional de tot el tetràmer sencer.

Si en el cas de l'avaluació en tampó fosfat es comprova quins són els residus més afectats, sembla que cada unitat de pèptid no interacciona només amb els residus d'un monòmer sinó amb els de diferents monòmers a la vegada. Tot i que degut a la proximitat dels diferents motius tetraaniònics del tetràmer es poden fer diferents interpretacions, sembla que el pèptid candidat 4 realment interacciona amb el motiu tetraaniònic format, per exemple, pels residus E343 i E349 del monòmer A, el residu D352 del monòmer B i el residu E336 del monòmer D (figura 3.7).



**Figura 3.7** Representació d'una de les zones de reconeixement de la p53\_tetS. En lila s'indiquen els residus més afectats en l'avaluació en tampó fosfat i en taronja els carboxilats dels residus àcids presumptament involucrats en la interacció.

Així doncs, per a cada tetràmer hi ha quatre zones de reconeixement com aquesta. Tenint en compte la simetria de la p53\_tetS, aquesta es podria comparar amb un paral·lelepípede en el qual hi ha dues zones de reconeixement en una cara i dues més en la cara oposada (figura 3.8). L'observació de diferents afinitats, podria ser deguda a que si hi ha un pèptid unit en alguna de les zones, això n'afecti l'afinitat dels següents pèptids.



**Figura 3.8** Representació en paral·lelepípede de la p53\_tetS.

En el cas de l'avaluació en aigua, la delimitació de la zona de reconeixement és força més complicada perquè es veuen afectats molts més residus.

### 3.1.2 EXPERIMENTS BASATS EN EL LLIGAND

Des del punt de vista de la ressonància magnètica nuclear les principals diferències entre un lligand i una proteïna es deuen a la diferència de tamany. Així, mentre en el cas de la proteïna, en general, es té una espècie d'elevat pes molecular, en el cas del lligand normalment es té una espècie de baix pes molecular. Degut principalment a la diferent relaxació que es dona entre aquests tipus d'espècies, les condicions idònies per poder-ne observar els corresponents senyals són diferents.

Des del punt de vista de la RMN, quan un lligand relativament petit interacciona amb una molècula molt més gran com pot ser una proteïna, durant el temps que estan en contacte aquest lligand es comporta com si formés part de la proteïna. Així, hi ha tot un conjunt de tècniques que aprofiten aquest fenomen per tal de detectar la interacció entre un lligand i la corresponent proteïna. Aquestes tècniques, tenen l'avantatge que es realitzen treballant amb un gran excés de lligand i per tant, permeten estalviar força proteïna. També es podria pensar en avaluar com varien els desplaçaments químics dels nuclis del lligand quan s'hi addiciona la proteïna, però per poder observar aquest efecte s'haurien d'afegir quantitats equimolars de proteïna.

En aquest treball s'ha intentat utilitzar la tècnica de STD ("Saturation Transfer Difference") i la de trNOE ("transferred NOE") per tal d'estudiar el procés de reconeixement que es dona entre el Candidat 4 i la p53\_tetS. Prèviament, però, s'ha dut a terme l'assignació dels protons del pèptid.

### 3.1.2.1 Assignació del pèptid Candidat 4

L'assignació completa dels protons del pèptid Candidat 4, s'ha realitzat a partir dels espectres obtinguts mitjançant experiments TOCSY i NOESY a diferents temperatures.

Mitjançant el TOCSY a 25°C, s'han pogut identificar els sistemes de spin de cada tipus de residu, però a aquesta temperatura en el NOESY no s'han pogut observar suficients NOEs per dur a terme l'assignació seqüencial.

A 5°C, la quantitat de NOEs observats ha estat molt major i mitjançant un TOCSY i un NOESY s'ha pogut dur a terme l'assignació completa dels protons del pèptid Candidat 4 (figura 3.9). Per obtenir l'assignació a 25°C, s'han correlacionat els senyals obtinguts a 5 i 25°C mitjançant diferents espectres TOCSY a 10, 15 i 20°C.

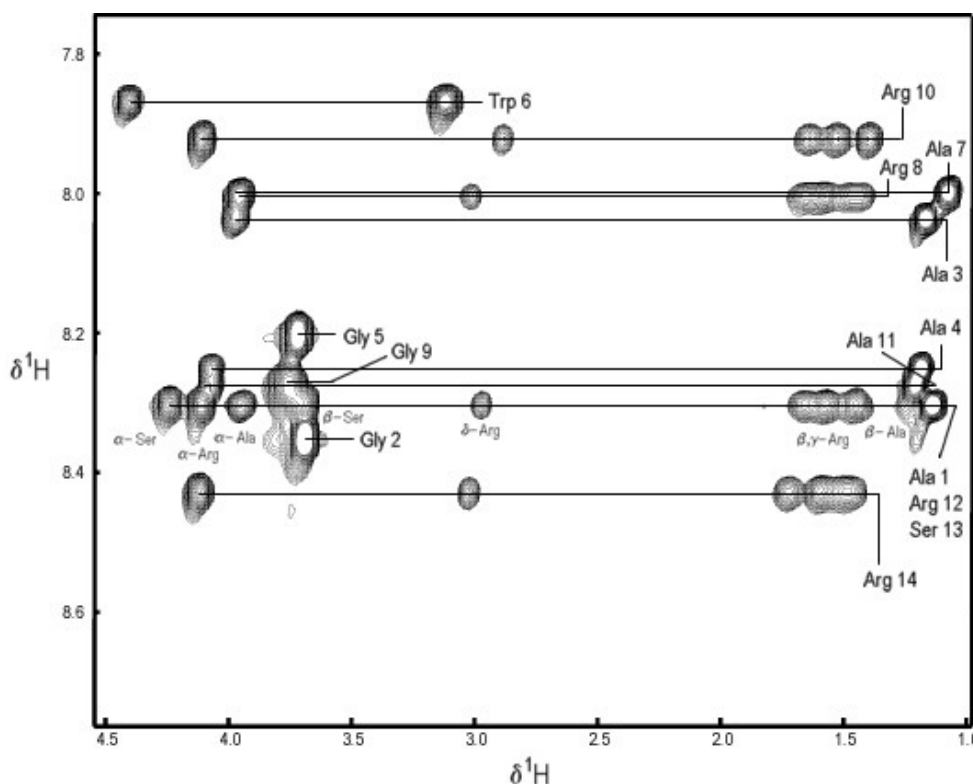


Figura 3.9 TOCSY del Candidat 4 a 5°C (seqüència: Ac-<sup>1</sup>AGAAGWARGRARS<sup>14</sup>R-NH<sub>2</sub>).

### 3.1.2.2 “Saturation Transfer Difference” (STD)

Mitjançant la irradiació continua a una freqüència que coincideixi amb el desplaçament químic es pot saturar qualsevol nucli d'una molècula. A més a més, aquesta saturació es transfereix als nuclis de la mateixa naturalesa de la molècula i es pot observar com disminueix la intensitat dels senyals tant d'aquest nucli com dels de la resta de la molècula. Aquest fenomen es coneix com a transferència de saturació i la seva eficàcia també depèn del tamany de la molècula.

Si es considera una situació en la qual un lligand interacciona amb una proteïna i se satura un dels nuclis de la proteïna, aquesta transferència de saturació també es pot donar cap al lligand en l'interval de temps que aquest està unit a la proteïna<sup>119</sup>. En aquest sentit, si la interacció entre el lligand i la proteïna és d'intercanvi ràpid en l'escala de temps de la RMN, quan es realitza la detecció del lligand es detecten també molècules les quals estan lliures però que durant l'experiment han estat en contacte amb la proteïna. Així doncs, es detecten molècules a les quals se'ls hi ha transferit una part de la saturació i per tant, es produeix una atenuació en la intensitat dels senyals dels seus nuclis. En conclusió, en el cas que hi hagi una interacció entre el lligand i la proteïna governada per una situació d'intercanvi ràpid, si se saturen els nuclis de la proteïna durant l'experiment, es produeix una disminució en la intensitat dels senyals dels nuclis del lligand lliure.

A la pràctica, però, aquesta disminució és difícil de mesurar i s'utilitzen espectres de diferència. En un primer espectre la freqüència d'irradiació no coincideix amb la de cap protó ni de la proteïna ni del lligand, de manera que no es produeix cap fenomen de saturació. El següent espectre, s'adquireix saturant la proteïna i es resta del primer espectre. Així, si el lligand no interacciona amb la proteïna els dos espectres seran idèntics i en la resta s'eliminen els senyals. Per contra, si es produeix la interacció disminueix la intensitat dels senyals en el segon espectre, i en fer la resta encara hi quedaran els senyals de la molècula. En alguns casos fins i tot, es pot diferenciar quin són els protons que queden més propers a la interfase entre el lligand i la proteïna, ja que en aquesta zona l'efecte de la transferència de saturació és més notori. Aquesta fet es pot utilitzar per determinar quin és l'epítop del lligand (figura 3.10)<sup>120</sup>.

---

<sup>119</sup> Mayer, M. & Meyer, B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (1999), **38**, 1784-1788

<sup>120</sup> Mayer, M. & Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc.*, (2001), **123**, 6108-6117



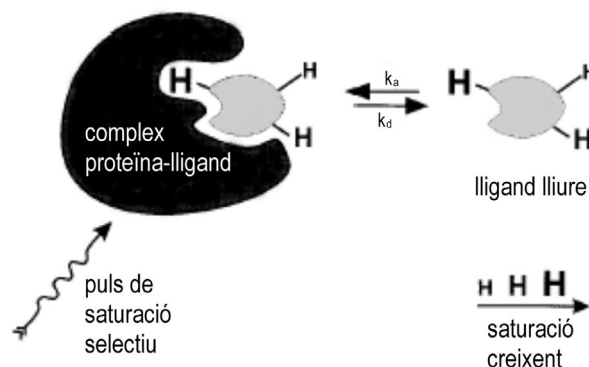


Figura 3.10 Esquema de la utilització de STD per a determinar l'epítip del lligand.

En aquesta tècnica és important que la proteïna sigui bastant més gran que el lligand, però no hi ha límit superior en el tamany de la proteïna. De fet, s'ha utilitzat eficaçment tant per estudiar la interacció de proteïnes unides a suports sòlids com per a estudiar la interacció amb proteïnes de membrana unides a liposomes<sup>121</sup>. També s'ha utilitzat amb èxit per analitzar mescles de productes amb senyals diferenciables en un espectre monodimensional de  $^1\text{H}$ <sup>122</sup>.

Tenint en compte la diferència de tamany que hi ha entre la p53\_tetS i el pèptid Candidat 4 (26KDa en front de 1,5KDa), ha semblat interessant comprovar la validesa d'aquesta tècnica per estudiar-ne el procés de reconeixement.

#### Experiments realitzats<sup>123</sup>

S'ha intentat detectar la interacció entre la p53\_tetS i el Candidat 4 utilitzant diferents excessos de pèptid i diferents medis i temperatures. En cap cas, però, s'han pogut observar senyals inequívocs atribuïbles a un procés de transferència de saturació de la proteïna cap al pèptid.

#### 3.1.2.3 “Transferred NOE” (trNOE)

Aquesta tècnica utilitza una filosofia molt similar a la de STD, però en aquest cas es considera la diferent magnitud que tenen els NOEs d'una molècula petita i els d'una macromolècula. Per a una molècula petita com el lligand Candidat 4 els NOEs en general tenen un valor força petit i positiu. En canvi per a una macromolècula com la p53\_tetS, els NOEs tenen un valor molt més gran i negatiu.

<sup>121</sup> Meinecke, R & Meyer, B, *J. Med. Chem.*, (2001), **44**, 3059-3065

<sup>122</sup> Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M. & Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc.*, (1999), **121**, 5336-5337

<sup>123</sup> Aquest treball ha estat realitzat pel Dr. Miguel Feliz de la Unitat de RMN d'Alt Camp dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

Quan un lligand està unit a una proteïna els NOEs tant intra com intermoleculars passen a tenir un valor més gran i negatiu si es comparen amb els valors dels NOEs del lligand lliure. Així, si s'adquireix un espectre NOESY es detectaran els NOEs corresponents al lligand lliure, però en el cas que hi hagi interacció entre la proteïna i el lligand i aquesta estigui governada per una situació d'intercanvi ràpid en l'escala de temps de la ressonància magnètica nuclear, en dur a terme l'adquisició també es detectaran lligands que en el transcurs de l'experiment hauran estat en contacte amb la proteïna i per tant s'observaran també els NOEs corresponents al lligand unit a la proteïna<sup>124</sup>. Aquests NOEs, seran els característics d'una proteïna, és a dir, amb un valor gran i negatiu.

A la pràctica el que es fa, és adquirir un espectre NOESY en absència de proteïna i un altre espectre NOESY en presència de proteïna. Si en el segon espectre apareixen nous pics de correlació, indica que es produeix alguna mena d'interacció entre el lligand i la proteïna. Aquesta tècnica és especialment interessant si es té en compte que els nous pics de correlació que s'observin, seran NOEs entre protons que estan propers en l'espai en la forma enllaçada a la macromolècula, i per tant aquesta pot ser una tècnica molt útil per a estudiar quina és la conformació del lligand en la forma enllaçada.

#### Experiments realitzats

S'ha adquirit l'espectre NOESY d'una mostra de Candidat 4 en absència i en presència de 0,03; 0,05 i 0,1 equivalents de p53\_tetS. En cap cas, però, s'ha observat l'aparició de senyals inequívocament assignables a un fenomen de trNOE. Els pocs senyals que apareixen quan s'addiciona proteïna, sembla que provenen de NOEs entre nuclis de la mateixa proteïna.

#### **3.1.2.4 Conclusió**

Tot i que s'ha pogut detectar clarament la interacció del pèptid Candidat 4 amb la p53\_tetS mitjançant les tècniques basades en la proteïna, no s'ha pogut fer mitjançant les tècniques basades en el lligand.

Tal i com s'ha esmentat, la STD i el trNOE són tècniques molt útils quan es vol detectar la interacció entre un lligand i una proteïna en una situació d'intercanvi ràpid en l'escala de temps de la RMN. Així, normalment funcionen molt bé quan la  $k_d$  és superior a 0,1-0,01Hz. Considerant una  $k_a$  de  $10^6$ , aquests casos corresponen a una  $K_D$  de l'ordre de mM- $\mu$ M<sup>125</sup>.

És possible que en el cas de la interacció entre el Candidat 4 i la p53\_tetS hi hagi una situació d'intercanvi lent, i per això s'ha obtingut un resultat negatiu en l'avaluació mitjançant STD i trNOE. De

---

<sup>124</sup> Ni, F., *Prog. in NMR Spectrosc.*, (1994), **26**, 517-606

<sup>125</sup> Meyer, B. & Peters, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2003), **42**, 864-890

fet, els resultats obtinguts mitjançant ressonància de plasmó superficial indiquen que la  $k_d$  és de l'ordre de 0,01-0,001Hz.

## 3.2 RESSONÀNCIA DE PLASMÓ SUPERFICIAL

El fenomen de la ressonància de plasmó superficial (RPS) es produeix quan un feix de llum és reflexat en un film conductor situat en la interfase de dos medis amb diferent índex de refracció. En aquesta situació, a un cert angle, es produeix una disminució de la intensitat del feix de llum reflexat. Aquest angle, depèn de l'índex de refracció del medi situat al costat contrari d'on es produeix la reflexió (figura 3.11)<sup>126</sup>.

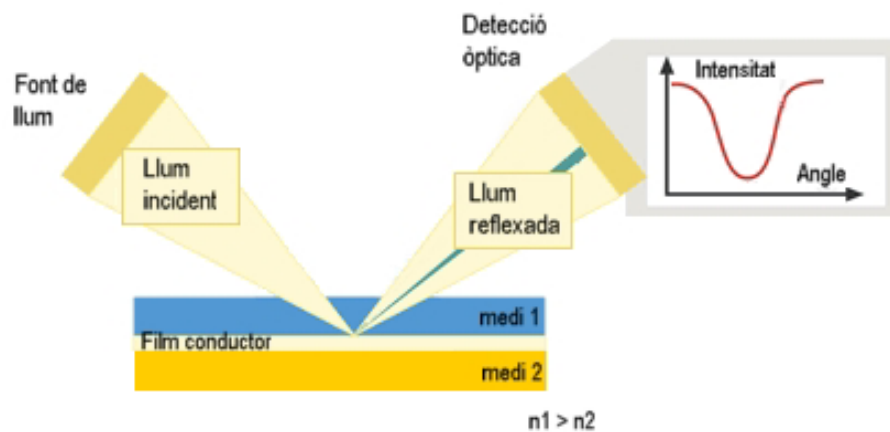


Figura 3.11 – Representació esquemàtica del fenomen de la RPS.

### 3.2.1 BIACORE

Existeixen diferents cases comercials que ofereixen biosensors basats en la RPS, però la tecnologia més popular és la desenvolupada per Biacore AB (Uppsala, Suècia)<sup>127</sup>. En els sistemes basats en la tecnologia Biacore s'utilitza un xip el qual defineix dos medis separats per una petita làmina d'or de 50nm que actua com a film conductor. En un costat de la làmina hi ha un prisma de vidre que actua com a medi on hi ha la llum incident, i en l'altre costat de la làmina hi ha la mostra que es vol analitzar. Per tal d'avaluar si es produeix alguna mena d'interacció, en el costat de la mostra s'hi immobilitza el lligand i

<sup>126</sup> Garland, P.B., *Q. Rev. Biophys.*, (1996), **2**, 91-117

Schuck, P., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, (1997), **26**, 541-566

<sup>127</sup> Rich, R.L. & Myska, D.G., *J. Mol. Recognit.*, (2000), **13**, 388-407

posteriorment s'injecta l'analit mitjançant un sistema de canals de flux continu. Si l'analit s'uneix al lligand immobilitzat, varia la concentració del medi, i per tant també en varia el seu índex de refracció. Aquesta variació en l'índex de refracció, provoca al seu torn una variació en l'angle del mínim de intensitat del feix reflexat. Mitjançant aquesta tecnologia, el que realment es mesura és el valor d'aquest angle, i es representa la seva variació en funció del temps. Aquesta representació s'anomena sensograma (figura 3.12)<sup>128</sup>.

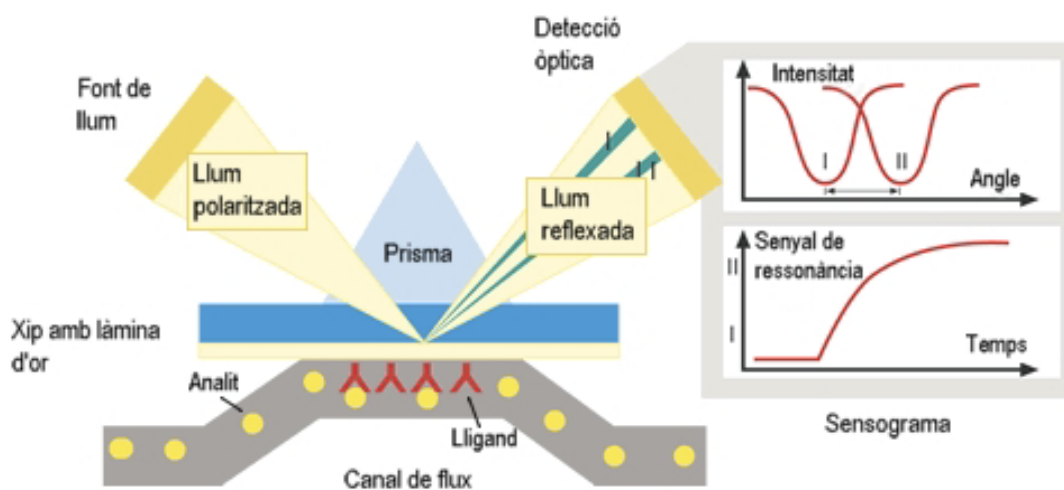


Figura 3.12 Representació esquemàtica de la tecnologia Biacore basada en el fenomen de la RPS.

Com a feix incident, s'utilitza un feix de llum polaritzat. S'ha de tenir en compte que el feix de llum no és absorbit per la mostra, sinó que degut al fenomen de la RPS es dissipa en la làmina d'or. Aquesta és una de les grans avantatges de la utilització de la RPS en l'estudi de les interaccions biomoleculares, ja que en ser una tècnica no invasiva, es poden realitzar mesures amb mostres opaques o tèrboles sense que es produeixin distorsions degudes a l'absorció o dispersió de la llum.

La variació de l'angle del mínim de intensitat del feix reflexat, s'expressa en unitats de ressonància (RUs). Cada RU equival a un desplaçament de  $0,0001^\circ$  que, en general, per a proteïnes és equivalent a una variació de concentració en la superfície del sensor d'aproximadament  $1\text{pg}/\text{mm}^2$ . Així doncs, aquesta és una tècnica que des del punt de vista de la quantitat de mostra és molt poc exigent.

Una altra avantatge d'aquesta tècnica és que no necessita introduir ni en el lligand ni en l'analit cap mena de marcatge, i l'únic requeriment és el de poder immobilitzar el lligand en la superfície de la làmina d'or del xip de forma efectiva i estable.

Però la gran diferència de la ressonància de plasmó superficial respecte altres metodologies utilitzades en l'estudi de les interaccions biomoleculares, és que permet observar com es produeix la

<sup>128</sup> <https://www.biacore.com>

interacció en temps real (figura 3.13). En el procediment habitual, s'injecta mitjançant un flux continu la mostra amb l'analít sobre la superfície que conté el lligand immobilitzat. Si es produeix interacció, s'obté una corba d'associació a partir de la qual es pot obtenir la  $k_a$ . Posteriorment, s'atura la injecció d'analít, però es manté un flux continu utilitzant el mateix dissolvent que en la injecció de l'analít. A partir d'aquest moment, s'observa com la resposta va disminuint degut a la dissociació, fet que permet obtenir-ne la  $k_d$ . A més a més, l'increment de resposta que s'ha produït en la injecció de l'analít dóna una idea de la quantitat d'analít que s'hi ha unit. A partir de tots aquests valors, es pot obtenir el valor de la constant d'afinitat ( $K_A$ ), així com la  $\Delta H^\circ$  i la  $\Delta G^\circ$ . Finalment, s'injecta una solució de regeneració la qual trenca totalment el complex no covalent format pel lligand i l'analít i s'obté novament la superfície inicial.

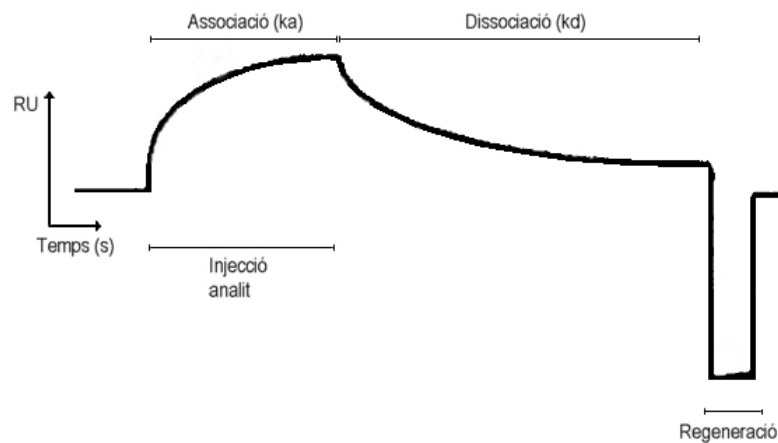
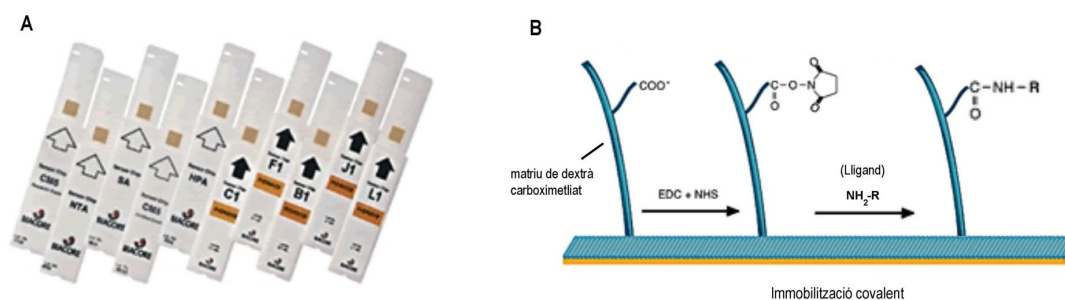


Figura 3.13 Perfil representatiu d'un sensograma.

En la tecnologia Biacore, es poden utilitzar diferents tipus de xips que bàsicament es diferencien en el tipus de superfície que hi ha en el costat on s'hi immobilitza el lligand. El xip més comú, però, és el xip CM5, al qual s'ha dipositat una matriu de dextrà carboximetilat sobre la superfície d'or (figura 3.14). Amb aquests xips, s'immobilitza covalentment el lligand mitjançant reacció dels carboxilats de la superfície del xip amb un grup  $-NH_2$ ,  $-CHO$ ,  $-OH$ ,  $-SH$  o  $-COOH$  del lligand. En química de proteïnes, en general s'activen els carboxilats mitjançant la formació d'un éster actiu i s'hi immobilitza el lligand mitjançant la formació d'un enllaç amida.



**Figura 3.14 A** – Xips disponibles en la tecnologia BIACORE. **B** – Esquema d'immobilització d'un lligand en un xip tipus CM5 mitjançant la formació d'un enllaç amida.

La introducció a principis dels anys 90 dels biosensors basats en el fenomen de la ressonància de plasmó superficial ha suposat una petita revolució en l'estudi de les interaccions biomoleculares<sup>129</sup>. De fet, des de la comercialització d'instrumentació basada en aquest fenomen cada any han aparegut més publicacions que l'utilitzen en l'estudi de la interacció de diferents sistemes. Aquests estudis inclouen un ampli ventall d'exemples, des de la interacció de diferents lligands amb proteïnes<sup>130</sup> o ADN<sup>131</sup> fins a la interacció amb virus o cèl·lules<sup>132</sup>. Aquest increment en la utilització de la RPS, es deu bàsicament a la capacitat de poder analitzar en temps real com es dona el procés de reconeixement entre el lligand immobilitzat i l'analit, fet que dona informació tant cinètica com termodinàmica de la interacció. A més a més, és una tècnica que consumeix molt poca mostra i que permet automatitzar-ne en cert grau el funcionament.

En aquest treball, ha semblat molt interessant explorar la utilització de la ressonància de plasmó superficial, mitjançant la tecnologia Biacore, en l'estudi de la interacció entre el Candidat 4 i la p53<sub>tetS</sub>, ja que d'una banda ens pot permetre caracteritzar un mica millor la interacció i de l'altra, és possible que ens pugui permetre dissenyar un experiment per avaluar un nombre relativament gran de pèptids de forma fiable i en poc temps.

<sup>129</sup> Van Regenmortel, M.H.V., *Biochem. Soc. Trans.*, (1999), **27**, 329-331

<sup>130</sup> Gomes, P., Giralt, E. & Andreu, D., *Vaccine*, (2000), **18**, 362-370

<sup>131</sup> Ciolkowski, M.L., Fang, M.M. & Lund, M.E., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2000), **22**, 1037-1045

<sup>132</sup> Fernvik, E., Lundahl, J., Mangusson, C.G.M. & Halldén, G., *Inflamm. Res.*, (1999), **48**, 28-35

### 3.2.2 CONDICIONS EXPERIMENTALS

La RPS és una tècnica molt sensible que requereix una delicada utilització. Per tal d'evitar artefactes i procurar mantenir unes condicions el més reproduïbles possible, en general, s'han utilitzat les següents condicions experimentals<sup>133</sup>:

#### Reactius i aparell

En tots els casos, el dissolvent utilitzat s'ha filtrat amb un filtre de 0,22µm i s'ha desgassat mitjançant sonicació durant aproximadament 2h, exceptuant els tampons comercials els quals ja venen condicionats.

Pel que fa a l'aparell, un cop per setmana s'han realitzat els protocols de rentat de tot el sistema.

#### Immobilització

En la majoria dels casos s'ha immobilitzat el lligand en la superfície del xip mitjançant la formació d'un enllaç amida. L'activació dels carboxilats s'ha realitzat mitjançant la formació de l'éster actiu amb EDC (*N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)carbodiimida) i NHS (*N*-hidroxisuccinimida). Després de l'addició del lligand amb l'extrem N-terminal lliure, s'han eliminat els ésters actius restants mitjançant l'addició d'etanolamina.

En general, s'ha immobilitzat el pèptid H-Candidat 4 i s'ha utilitzat la p53\_tetS com a analit. Això s'ha fet així perquè degut al major tamany de la p53\_tetS, en el cas que es produeixi interacció, l'efecte en la resposta serà més marcat que si s'immobilitzés la p53\_tetS i s'utilitzés el pèptid Candidat 4 com a analit.

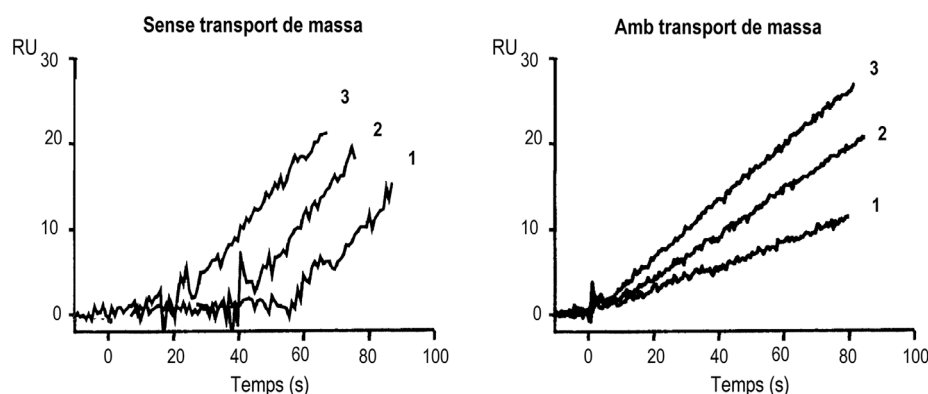
#### Transport de massa

Hi ha casos en els quals es troba que el procés d'interacció entre el lligand i l'analit no està controlat per la pròpia afinitat, sinó per la difusió. Aquest fenomen, es coneix com l'efecte del transport de massa i es pot donar en casos en els quals l'afinitat és molt alta o en els quals s'ha immobilitzat una quantitat excessiva de lligand. Per detectar si s'està donant aquest efecte, s'ha de tractar la superfície amb la mateixa solució d'analit a diferents fluxos. Si s'observa un pendent diferent en la part inicial de la corba d'associació, significa que el procés de reconeixement està controlat pel transport de massa. Per contra, si el pendent és sempre el mateix, significa que el procés de reconeixement està controlat només per la pròpia afinitat (figura 3.15). En cas de produir-se l'efecte del transport de massa, aquest es pot compensar treballant a fluxos més alts.

---

<sup>133</sup> Myszk, D.G., *J. Mol. Recognit.* (1999), **12**, 279-284

Roden, L.D. & Myszk, D.G., *Biochem. Bioph. Res. Co.*, (1996), **225**, 1073-1077



**Figura 3.15** Comparació d'una situació controlada per l'afinitat del sistema amb una controlada per l'efecte del transport de massa. On flux  $1 < 2 < 3$ .

És important treballar en condicions en les que el procés no estigui controlat pel transport de massa, de manera que s'ha treballat sempre a un flux a partir del qual ja no variés el pendent de la corba d'associació.

### Blancs

Per dur a terme l'anàlisi de la interacció s'ha utilitzat una doble referència per tal d'evitar tan els artefactes de la pròpia superfície com els artefactes produïts per interaccions no específiques de l'analit amb la superfície. Així, al sensograma obtingut per a cada mostra d'analit se l'hi han restat els següents sensogrames:

- 1- Sensograma obtingut de la injecció d'un blanc, és a dir una mostra amb el mateix dissolvent però sense l'analit.
- 2- Sensograma obtingut de la injecció de la mateixa mostra d'analit però en una superfície de referència, és a dir una superfície en la qual no s'hi ha immobilitzat lligand. Per tal de tenir la màxima fiabilitat, per preparar les superfícies de referència s'ha seguit exactament el mateix procediment d'immobilització, però exclouent la injecció del lligand.

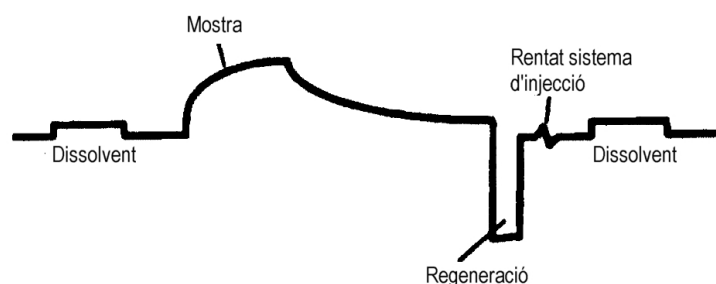
A l'inici i al final de cada injecció de mostra, hi ha una pujada i una baixada sobtada de la resposta. Aquests salts, es deuen al diferent índex de refracció que té la pròpia mostra que conté l'analit dissolt respecte el dissolvent que va circulant pel sistema. Mitjançant aquesta doble referència, en els sensogrames resultants també s'hi minimitza aquest efecte.

### Regeneració

Després del tractament de la superfície amb la solució de regeneració, s'han realitzat diferents rentats per tal d'evitar que restes d'aquesta solució de regeneració puguin interferir en el següent anàlisi.



Primerament, després de cada regeneració s'ha rentat el sistema d'injecció i s'ha injectat un mica de dissolvent per tal de fer una neteja completa del sistema. A més a més, per tal d'assegurar que no quedin restes de solució de regeneració, abans de cada injecció d'analit, també s'ha injectat una mica més de dissolvent (figura 3.16).



**Figura 3.16** Esquema del cicle d'anàlisi amb cadascun dels rentats utilitzats.

Per a cada superfície s'han buscat unes condicions de regeneració amb les quals es recuperés el màxim possible la resposta prèvia a la injecció de la mostra amb l'analit. És important treballar en unes condicions de regeneració que dissociïn completament el complex entre el lligand i l'analit, però que no siguin tampoc massa fortes, ja que podrien fer malbé la superfície amb el lligand immobilitzat. De fet, les superfícies tenen una vida limitada i en tots els casos acaben quedant inutilitzades després d'uns quants cicles d'anàlisi. La durada de la superfície depèn principalment de l'estabilitat de lligand i de la química utilitzada per dur-ne a terme la immobilització.

En aquest treball, els tractaments amb solució de regeneració s'han realitzat mitjançant injeccions de 1 minut, i en general s'ha utilitzat HCl 10mM, NaOH 10mM o NaCl 1M.

### Temperatura

En tots els casos els experiments s'han realitzat a 25°C.

### Ajust de les dades

Per tal d'obtenir el valor de la constant d'afinitat s'han ajustat les dades als diferents models disponibles en el programa BIAevaluation 3.0<sup>134</sup>. En l'ajust, s'utilitzen mètodes de regressió no lineal per mínims quadrats, en els que es busca una minimització de la suma dels quadrats dels valors residuals [2], els quals corresponen a la diferència entre el valor obtingut en l'ajust ( $r_{ajust}$ ) i el valor experimental ( $r_{experimental}$ ).

$$[2] \quad S = \sum_i^n (r_{ajust} - r_{experimental})^2$$

<sup>134</sup> "BIAevaluation software handbook: version 3.0", Biosensor AB, Uppsala, 1997

La qualitat de cada ajust s'ha considerat en base a quatre criteris: primerament s'ha considerat necessari tenir una valor de  $\text{Chi}^2$  inferior a 10. En segon lloc, s'ha realitzat una inspecció visual de la superposició de les dades experimentals amb les corbes generades en l'ajust. A continuació, s'ha comprovat que no hi haguessin desviacions no aleatòries dels valors residuals, ja que això indica que s'ha utilitzat un mal model. Per últim, s'ha tingut en compte el sentit físic del model utilitzat.

### 3.2.3 EXPERIMENTS REALITZATS

En el transcurs d'aquest treball s'ha trobat que els xips CM5 no eren el més adequats per dur a terme l'estudi d'interacció entre el Candidat 4 i la p53\_tetS, de manera que s'han hagut d'explorar altres tipus de superfície. A continuació es descriu el treball realitzat en funció del tipus de superfície utilitzada.

#### 3.2.3.1 Xips tipus CM5

En una primera aproximació, per dur a terme l'estudi de la interacció s'han utilitzat els xips CM5, ja que són els xips estàndards d'anàlisi en la tecnologia Biacore. Així, sobre la superfície de dextrà carboximetilat, s'hi ha immobilitzat el pèptid H-Candidat 4 mitjançant la formació d'un enllaç amida. Per avaluar la interacció s'ha analitzat la variació de la resposta en tractar la superfície amb mostres de diferents concentracions de p53\_tetS.

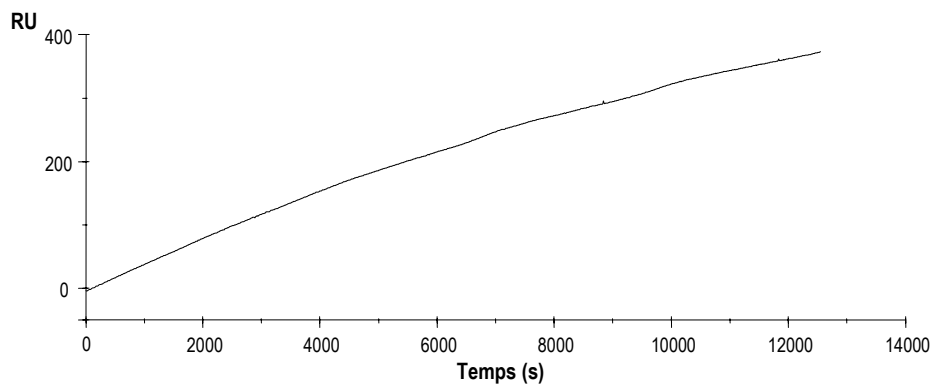
Les anàlisis preliminars, suggereixen que efectivament es produeix interacció entre el pèptid i la p53\_tetS, però s'ha observat que per a una mateixa mostra aparentment l'afinitat disminueix al llarg del temps. A més, durant el diferents cicles d'anàlisi, s'ha observat un increment progressiu del nivell de resposta de la línia de base.

Inicialment, s'ha cregut que el problema podia ser una mala regeneració de la superfície que provoqués que cada vegada quedessin menys pèptids "lliures" per poder interaccionar amb noves molècules de p53\_tetS. Per aquesta raó, s'han provat diverses condicions de regeneració<sup>135</sup>, però en cap cas s'ha aconseguit mantenir la mateixa variació de resposta per a una mateixa mostra de p53\_tetS en anàlisis consecutives.

Posteriorment, s'ha decidit preparar una nova superfície amb pèptid immobilitzat, i s'ha comprovat quina era l'estabilitat de la línia de base mantenint un flux constant de tampó HBS (figura 3.17). En aquesta anàlisi, s'ha pogut observar que al llarg del temps es produeix una forta deriva de la resposta.

---

<sup>135</sup> Andersson, K., Hämäläinen, M. & Malmqvist, M., *Anal. Chem.*, (1999), **71**, 2475-2481



**Figura 3.17** Variació de la línia de base en el temps per a un xip CM5 amb el pèptid Candidat 4 immobilitzat.

Un possible explicació a aquest fenomen és que el pèptid Candidat 4, en ser un pèptid amb una proporció tan elevada d'arginines, interacciona de forma no específica amb els carboxilats lliures que queden en la matriu de dextrà del xip. Aquesta interacció, provoca una compactació progressiva de la matriu que es tradueix en un increment progressiu de la resposta. Amb aquesta explicació, també es pot entendre la disminució aparent de l'afinitat de la p53\_tetS en cicles consecutius. De fet, mitjançant tractaments amb NaCl 1M durant 1 minut, s'aconsegueix una recuperació parcial de la resposta, però passats uns minuts es torna a produir la forta deriva de la línia de base. A més a més, aquest problema es veu agreujat pel fet que no es pot treballar amb eluents amb una elevada força iònica que poguessin compensar aquest efecte, ja que precisament la interacció entre el pèptid i la p53\_tetS és de caràcter bàsicament electrostàtic i l'afinitat disminueix en augmentar la força iònica.

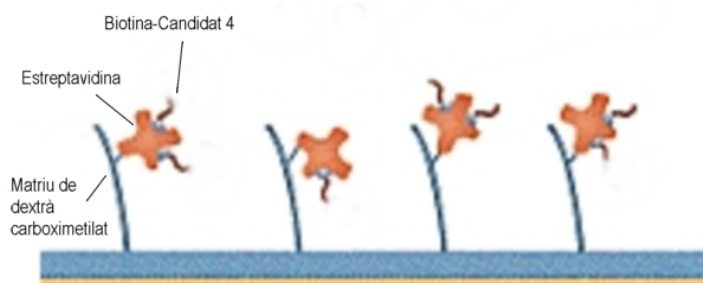
Per intentar contrarestar aquest efecte, s'han preparat diferents superfícies amb diferents nivells d'immobilització de pèptid, però no s'han aconseguit millores substancials. En dur a terme la immobilització del pèptid, també s'ha provat d'activar tots els carboxilats de la superfície per aconseguir que un cop realitzat el procediment d'immobilització no hi quedessin carboxilats lliures. De tota manera, però, també s'ha observat una forta deriva de la línia de base i per tant, s'ha decidit descartar la possibilitat d'immobilitzar en els xips CM5 el pèptid Candidat 4.

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, inicialment s'ha decidit immobilitzar el pèptid i utilitzar la p53\_tetS com a analit ja que en el cas que es produeixi interacció l'efecte en la resposta serà molt més marcat que si ho es fes al revés. En el grup, però, s'ha posat a punt un mètode per poder avaluar amb fiabilitat la interacció de pèptids petits amb anticossos immobilitzats en la superfície del xip CM5<sup>136</sup>. Per aquesta raó, s'ha decidit provar d'immobilitzar covalentment la p53\_tetS en la superfície del xip i utilitzar el pèptid Candidat 4 com a analit. En aquest cas, però, el problema ha estat que s'ha observat una forta deriva negativa de la línia de base amb el temps. Aquest fet, ha estat especialment greu en les etapes de regeneració.

<sup>136</sup> Gomes, P., Giralt, E. & Andreu, D., *J. Immunol. Methods*, (2000), **235**, 101-111

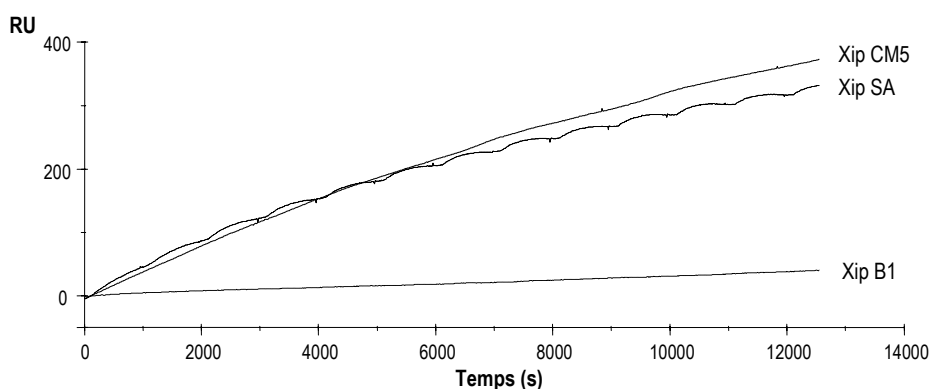
Aquesta deriva es pot explicar com a conseqüència d'una progressiva desestructuració de la p53\_tetS. S'ha de tenir en compte que la p53\_tetS és un tetràmer no covalent, de manera que si s'immobilitza, per exemple, un dels monòmers, com a conseqüència de l'equilibri reversible de desnaturalització / renaturalització, passat un temps en la superfície del xip només hi queda immobilitzat aquest monòmer.

Com a última alternativa, s'ha provat d'immobilitzar el pèptid Candidat 4 en altres tipus de xips similars als CM5. D'una banda, s'ha provat d'immobilitzar el pèptid en un xip SA (figura 3.18). Aquest xips, són iguals als CM5 però ja se'ls hi ha immobilitzat covalentment la proteïna estreptavidina. Així, per dur a terme la immobilització del lligand, en aquest xips s'aprofita l'elevadíssima afinitat que hi ha entre la biotina i la estreptavidina per immobilitzar-hi lligands biotinitats (en aquest cas el Biotina-Candidat 4).



**Figura 3.18** Representació esquemàtica de la superfície d'un xip SA.

També s'han utilitzat els xips B1 (actualment anomenats CM4), els quals tenen el mateix tipus de superfície que els xips CM5 però amb un menor densitat de carboxilats (aproximadament el 70% menys). Amb els xips SA, no s'ha aconseguit cap millora, però amb els xips B1 sí s'ha aconseguit disminuir moltíssim la deriva de la línia de base (figura 3.19).



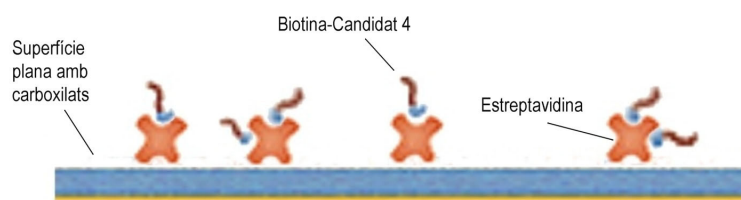
**Figura 3.19** Comparació de la deriva de la línia de base en el temps per als xips CM5, SA i B1 amb el pèptid Candidat 4 immobilitzat.

Tot i això, encara s'ha observat una certa deriva i s'ha decidit descartar els xips tipus CM5 per dur a terme l'estudi de la interacció entre el pèptid Candidat 4 i la p53\_tetS.

### 3.2.3.2 Xips C1

Els xips C1, de la mateixa manera que els xips CM5, estan formats per una superfície amb carboxilats lliures als quals s'hi immobilitza el lligand covalentment, però a diferència dels xips CM5, la superfície és plana. Inicialment, aquests xips es van comercialitzar amb la idea de ser utilitzats en casos amb analits molt voluminosos com cèl·lules o virus, els quals són massa grans per poder-se introduir en la matriu de dextrà dels xips tipus CM5.

En aquest treball, ha semblat interessant la possibilitat d'explorar la utilització d'aquests xips en l'estudi d'interacció, ja que *a priori*, en no haver-hi matriu de dextrà no s'haurien de reproduir els problemes observats amb els xips tipus CM5. De tota manera, és possible que si s'immobilitza directament el pèptid Candidat 4 sobre la superfície del xip rica en carboxilats, es produeixi també alguna mena d'interacció no específica que afecti la fiabilitat de l'anàlisi. Per aquesta raó, en el disseny de la preparació del xip, s'ha decidit preparar una superfície similar a la dels xips SA. Així, s'ha immobilitzat covalentment estreptavidina i posteriorment s'hi ha immobilitzat el pèptid Biotina-Candidat 4 (figura 3.20).



**Figura 3.20** Representació esquemàtica de la superfície preparada amb el xip C1.

Un problema que presenten aquests xips, és que la quantitat de lligand que s'hi pot immobilitzar és molt més baixa que en els xips CM5 (aproximadament un 90% menys). De tota manera, l'estreptavidina té quatre punts d'unió de biotina i això permet compensar en part aquest efecte. A més a més, en la preparació del xip s'ha intentat immobilitzar el màxim d'estreptavidina possible. Així, en l'etapa d'immobilització del pèptid s'han aconseguit increments de resposta de fins a 100RUs.

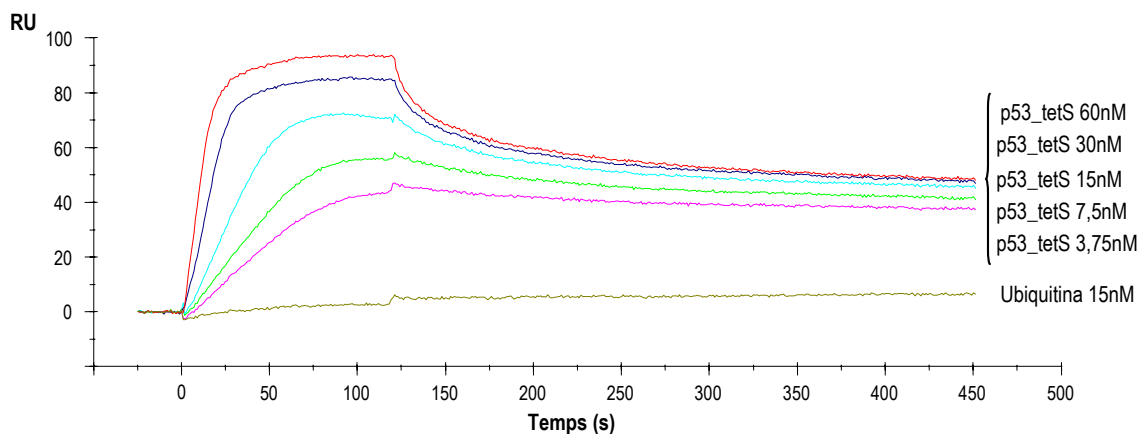
Un cop incorporat el pèptid Candidat 4, amb aquest tipus de xips s'ha observat una bona estabilitat de la línia de base. Pel que fa a l'estabilitat de la superfície, s'han obtingut resultats força reproduïbles en els primers 30 cicles d'anàlisi.

S'han realitzat anàlisis utilitzant com a eluent tant tampó fosfat 25mM a pH 7 com aigua a pH 7.

#### Avaluació en tampó fosfat 25mM pH 7

En l'anàlisi amb diferents concentracions de p53\_tetS es pot veure que es produeix una clara variació de la resposta en injectar la proteïna sobre la superfície amb el pèptid immobilitzat, confirmant

així que es produeix una interacció entre la p53\_tetS i el Candidat 4 (figura 3.21). A més a més, com a control negatiu s'ha utilitzat Ubiquitina, i s'ha pogut observar que amb aquesta proteïna no es produeix cap mena d'interacció.



**Figura 3.21** Variació de la resposta observada en tractar amb diferents concentracions de p53\_tetS una superfície C1 amb el pèptid Candidat 4 immobilitzat.

Mitjançant el programa d'avaluació de dades BIAevaluation 3.0 s'ha intentat ajustar les corbes obtingudes a diferents models. Primerament s'han ajustat les corbes a un model 1:1, però les dades experimentals no s'han pogut ajustar gens bé a aquest model. De la resta de models disponibles en el programa BIAevaluation, l'únic model que s'ha pogut ajustar a les dades ha estat el model en el qual l'analit (en aquest cas la p53\_tetS) és bivalent, fet que sembla indicar que la p53\_tetS interacciona amb més d'una unitat de pèptid Candidat 4.

Tenint en compte que la p53\_tetS conté 4 monòmers equivalents, és raonable utilitzar en l'ajust de les dades experimentals un model que consideri la multivalència de l'analit. Malauradament però, el programa d'ajust no incorpora cap model basat en un analit tetravalent, de manera que com a aproximació a aquesta situació, també s'han ajustat les dades experimentals utilitzant un model d'analit bivalent però considerant la concentració de dímer de p53\_tetS (taula 3.2). La qualitat de l'ajust s'ha pogut millorar lleugerament ajustant cadascuna de les corbes per separat, tot i que no s'ha observat cap variació significativa de la  $K_D$  resultant (figura 3.22).

Model		$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	Chi <sup>2</sup>
Langmuir 1:1		$2,5 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^9$	0,5	21
Analit bivalent (conc. tetràmer)	1	$6,3 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^7$	19	5
	2*	20,5	41,6	0,5	$2 \cdot 10^9$	
Analit bivalent (conc. dímer)	1	$2,9 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^7$	50	9
	2*	0,739	1,44	0,5	$2 \cdot 10^9$	

\* Per al segon lloc d'una les unitats de  $k_a$  són  $RU^{-1}s^{-1}$

Taula 3.2 Resultat de l'ajust obtingut utilitzant diferents models.

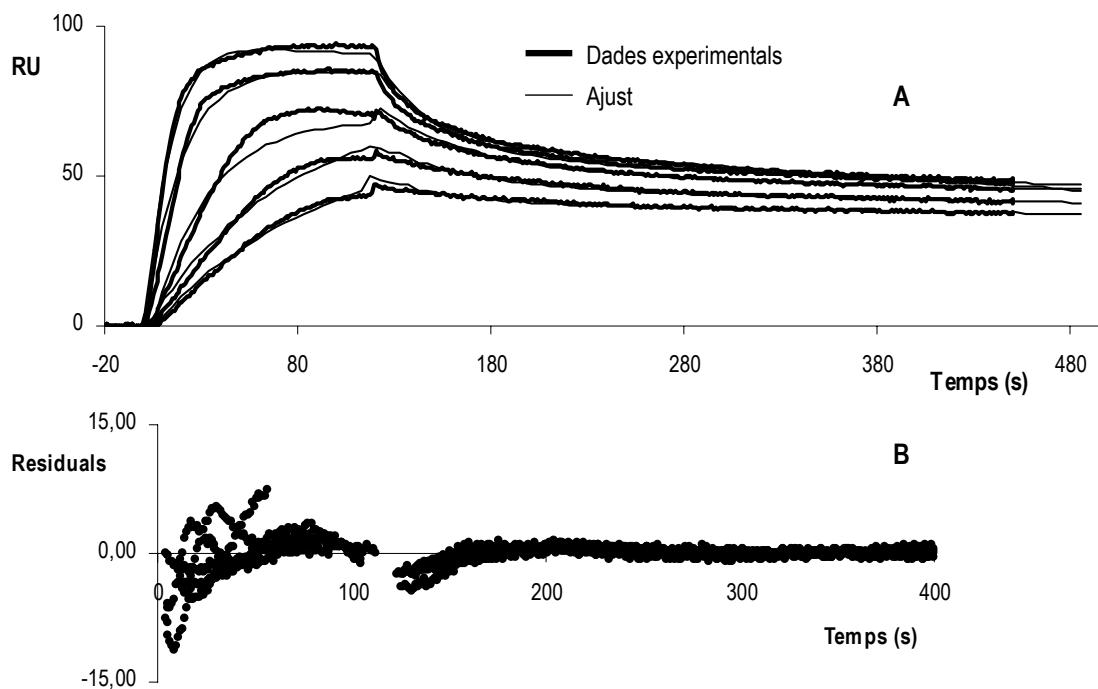


Figura 3.22 A- Superposició de les dades experimentals amb l'ajust individual de cada corba. B- Residuals.

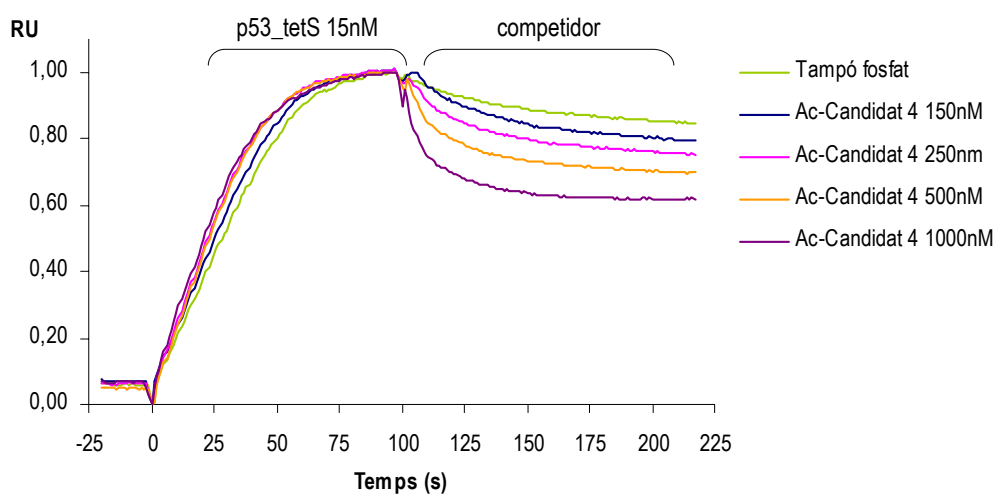
Tot i que en l'ajust de les dades es compleixen quasi bé tots els criteris establerts per a considerar la validesa de l'ajust, es pot veure com els valors residuals tenen una desviació no aleatòria, fet indicatiu que el model utilitzat no és el correcte. La raó més probable d'aquest problema, es troba en el fet que la p53\_tetS és una molècula tetravalent. També s'ha de tenir en compte que el fet que els lligands estiguin immobilitzats en la superfície del xip, condiciona enormement la formació de complexos d'estequeometria superior a 1:1, i per això en l'ajust amb aquest tipus de models sovint és difícil obtenir un bon ajust de les dades experimentals.

En base els resultats obtinguts, només es pot concloure que la p53\_tetS interacciona amb diferents unitats de Candidat 4 amb dues afinitats diferents. D'una banda, s'uneix a una unitat de pèptid amb una  $K_D$  de l'ordre de 10-100nM, i de l'altra s'uneix a una altra unitat de pèptid amb una afinitat molt més baixa.

Tot i això, considerant la geometria de la p53\_tetS, sembla més raonable pensar que hi puguin haver dos llocs d'elevada afinitat i dos llocs de baixa afinitat. Si això fos així, significaria que en l'ajust probablement s'ha sobreestimat el valor de la constant d'elevada afinitat. Pel que fa al valor de la constant de baixa afinitat, aquest és molt poc fiable, ja que en aquest tipus d'experiment, com que es treballa en condicions d'excés de p53\_tetS en general només es produeix la interacció pèptid-proteïna d'elevada afinitat.

Tot i les dificultats per utilitzar aquesta metodologia des d'un punt de vista quantitatiu, s'ha intentat posar a punt un mètode qualitatiu per avaluar l'afinitat d'altres lligands mitjançant anàlisis de competició. Aquestes anàlisis s'han realitzat mitjançant coinjeccions. Així, immediatament després de la injecció d'analit, sobre la superfície s'hi injecta el competidor. Si efectivament es produeix competició és d'esperar que la dissociació es doni més ràpidament. Per contra, si no es produeix competició la corba de dissociació no hauria de variar.

Per posar a punt el mètode, com a competidor s'ha utilitzat el mateix pèptid que està immobilitzat, és a dir el Candidat 4. Així, s'han realitzat diferents coinjeccions utilitzant en cada cas una concentració diferent d'Ac-Candidat 4. En la figura 3.23 es pot veure clarament com a mesura que s'utilitza una concentració més elevada d'Ac-Candidat 4, s'accelera més l'etapa de dissociació del complex que forma la p53\_tetS amb el pèptid immobilitzat en la superfície del xip.



**Figura 3.23** Anàlisi de competició amb diferents concentracions d'Ac-Candidat 4. Per facilitar la comparació de les corbes, s'ha normalitzat la variació de la resposta obtinguda en cada cas.

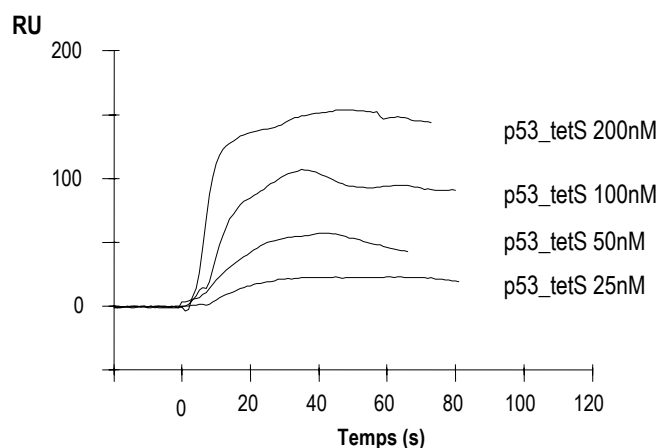


Així doncs, mitjançant aquest tipus d'anàlisi, en principi, es podria avaluar una quimioteca de pèptids per tal de veure quins competeixen en la interacció del pèptid Candidat 4 amb la p53\_tetS. A més a més, aquest resultat confirma que les variacions de resposta observades en injectar p53\_tetS, efectivament es deuen a una interacció entre la proteïna i el pèptid immobilitzat, i no a alguna interacció no específica de la proteïna amb la superfície del xip, ja que si fos així no s'observaria aquest efecte de competició en les corbes de dissociació.

Tot i els bons resultats obtinguts, s'han trobat moltes dificultats per tornar a preparar la superfície del xip i de fet no s'ha aconseguit tornar a preparar una superfície que permetés reproduir aquests resultats. En alguns casos, s'han pogut dur a terme anàlisis amb concentracions molt més elevades de p53\_tetS, però la interpretació de les corbes ha estat molt més difícil degut a les interaccions no específiques amb la superfície produïdes com a conseqüència de l'elevada concentració de p53\_tetS utilitzada. Com a alternativa, s'ha provat immobilitzar covalentment el pèptid H-Candidat 4, però de la mateixa manera que amb els xips CM5 s'ha observat una pèrdua progressiva d'afinitat degut a la interacció amb els carboxilats de la superfície.

#### Avaluació en aigua a pH 7

Mitjançant anàlisi en aigua, en injectar diferents concentracions de p53\_tetS també s'ha pogut observar una clara variació de la resposta. Tot i això, la forma de les corbes ha estat de molt més baixa qualitat que en el cas de l'anàlisi en tampó fosfat (figura 3.24).



**Figura 3.24** Variació de la resposta observada en tractar amb diferents concentracions de p53\_tetS una superfície C1 amb el pèptid Candidat 4 immobilitzat (H<sub>2</sub>O a pH7). No s'han pogut enregistrar les corbes de dissociació degut a entrades d'aire en les parts finals de l'injecció de p53\_tetS.

Tant el pH de l'aigua utilitzada en l'elució, com el pH de les diferents mostres de p53\_tetS s'ha ajustat individualment amb petites quantitats de NaOH 10mM i HCl 10mM. Així, en cada cas la concentració total de ions ha estat diferent. Com que la RPS depèn de les variacions en l'índex de

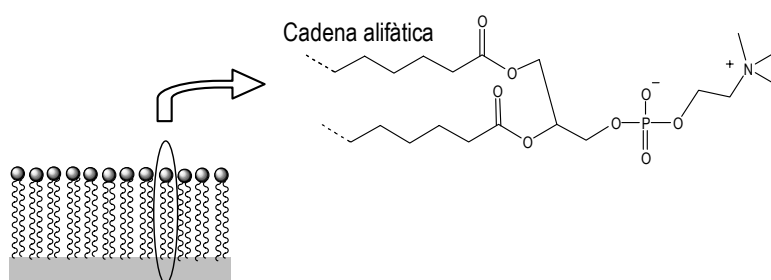
refracció del medi, és molt sensible a la concentració de ions i per això és possible que si no s'utilitzen medis tamponats, la forma de les corbes sigui molt més irregular. A més a més, la qualitat de les corbes també s'ha vista afectada per continues entrades d'aire al sistema.

Tot i els bons resultats obtinguts amb els xips C1, s'ha descartat per a l'avaluació de la quimioteca de pèptids basats en el Candidat 4 degut a la seva baixa reproduïbilitat.

### 3.2.3.3 Xips HPA

Aquests tipus de xips estan formats per superfícies amb alcantriols de cadena llarga, els quals formen una capa hidrofòbica plana i quasi cristal·lina. Mitjançant l'adsorció de liposomes sobre aquesta superfície hidrofòbica, es poden formar monocapes lipídiques molt útils per immobilitzar-hi, per exemple, receptors de membrana. Així, es pot estudiar la interacció d'aquests receptors amb diferents analits en un entorn similar al d'una membrana<sup>137</sup>.

Així doncs, mitjançant la utilització d'aquests xips, s'obté una superfície la qual no té els carboxilats lliures (figura 3.25), i per això ha semblat molt interessant explorar la utilització d'aquest tipus de superfície en l'anàlisi de la interacció del Candidat 4 i la p53\_tetS.



**Figura 3.25** Estructura esquemàtica d'una monocapa lipídica formada per unitats de fosfatidilcolina.

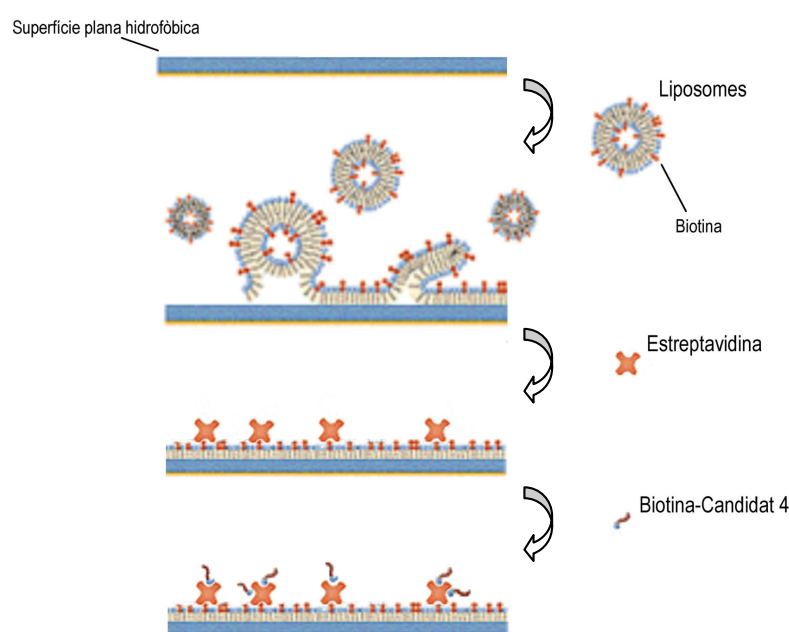
El problema que presenta la utilització d'aquests tipus de superfície, és que es necessita que el lligand contingui alguna part hidrofòbica que es pugui ancorar en la monocapa. Es podria plantejar la síntesis del pèptid Candidat 4 amb, per exemple, una unitat d'àcid gras en l'extrem N-terminal, però s'ha preferit buscar alguna alternativa que permetés utilitzar algun dels pèptids ja sintetitzats.

Així, s'ha dissenyat la preparació d'una superfície en base a dues idees diferents. D'una banda, en xips HPA s'ha descrit la preparació de monocapes lipídiques amb un 1% de fosfolípids biotinilats,

<sup>137</sup> Yu, Y., Van Wie, B.J., Koch, A.R., Moffett, D.F. & Davis, W.C., *Anal. Biochem.*, (1998), **263**, 158-168

mitjançant les quals s'ha estudiat la interacció de la biotina amb neutravidina<sup>138</sup>. De l'altra, s'han considerat els xips SA descrits anteriorment.

Així, sobre la superfície hidrofòbica d'un xip HPA s'hi ha format una monocapa lipídica amb 1% dels fosfolípids biotinitats. Posteriorment s'hi ha immobilitzat estreptavidina i finalment, aprofitant, la multivalència de la estreptavidina, s'hi ha immobilitzat el pèptid Biotina-Candidat 4 (figura 3.26). S'han trobat forces dificultats per preparar aquesta superfície, però al final s'ha pogut aconseguir. La metodologia utilitzada en la preparació de la superfície s'ha basat en criteris inspirats en treballs que descriuen la utilització de xips HPA<sup>139</sup>, i en treballs que descriuen la preparació d'una superfície similar sobre suports de vidre per tal de fer estudis d'hibridació de fragments d'ADN<sup>140</sup>.



**Figura 3.26** Esquema representatiu de la preparació de la superfície utilitzada amb els xips HPA.

La monocapa lipídica s'ha format amb liposomes de DMPC 1% (p/p) Biotina-DSPE ( $\varnothing=100\text{nm}$ ) preparats utilitzant extrusió. Aquest procés, permet obtenir vesícules unilamelars a partir de vesícules multilamelars, mitjançant la filtració a través de filtres de policarbonat amb un tamany de porus cada cop més petit fins.

L'anàlisi de la interacció amb la p53\_tetS s'ha dut a terme en tampó fosfat 25mM pH7 (figura 3.27). Tot i que també s'ha pogut observar interacció entre el Candidat 4 i la p53\_tetS, no s'ha pogut dur a terme un estudi fiable ja que en menys de 10 cicles d'anàlisi la superfície es desestructura i es fa malbé.

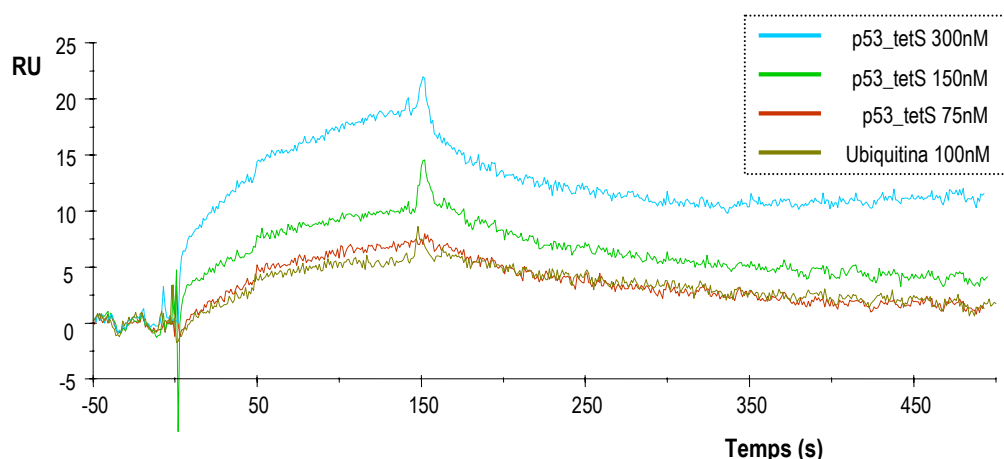
<sup>138</sup> Plant, A.L., Brigham-Burke, M., Petrella, E.C. & O'Shannessy, D.J., *Anal. Biochem.*, (1995), **226**, 342-348

<sup>139</sup> Cooper, M.A., Try, A.C., Carroll, J., Ellar, D.J. & Williams, D.H., *Biochim. Biophys. Acta*, (1998), **1373**, 101-111

<sup>140</sup> Li, J., Tan, W., Wang, K., Xiao, D., Yang, X., He, X. & Tang, Z., *Anal. Sci.*, (2001), **17**, 1149-1153

El principal problema que s'ha detectat, és un augment de l'adsorció no específica sobre la superfície hidrofòbica que queda descoberta quan es produeix una desestructuració de la monocapa lipídica. Per això, quan es tracta la superfície amb ubiquitina també s'obté un lleuger increment de resposta.

La causa més probable de la poca estabilitat de la monocapa lipídica, és la baixa força iònica del tampó utilitzat. Per aquesta raó, s'ha descartat realitzar l'anàlisi amb aquest tipus de xips en aigua.



**Figura 3.27** Sensogrames obtinguts en tractar amb diferents concentracions de p53\_tetS la superfície del xip HPA amb Candidat 4 immobilitzat.

S'ha intentat ajustar les corbes a diferents models. En aquest cas, el millor ajust s'ha obtingut mitjançant un model basat en una interacció 1:1 amb deriva de la línia de base (taula 3.28). Només s'han ajustat les dades corresponents a les corbes obtingudes amb p53\_tetS 300 i 150nM, ja que amb p53\_tetS 75nM s'ha obtingut un variació de resposta molt similar a la del control negatiu.

$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	Chi <sup>2</sup>
$7,7 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$\approx 1 \cdot 10^7$	$\approx 100$	0,18

**Taula 3.28** Taula resum del resultat de l'ajust.

A diferència del que s'ha observat en l'ajust de les corbes obtingudes amb els xips C1, en aquest cas es compleixen tot els criteris establerts per a considerar la validesa de l'ajust (figura 3.29). És de destacar el fet que en aquests experiments no s'obté un bon ajust amb el model bivalent. Una possible explicació, podria ser que tenint en compte que en la preparació de la superfície s'han utilitzat liposomes amb només un 1% (p/p) de Biotina-DSPE, en l'anàlisi amb p53\_tetS les diferents unitats de pèptid queden massa separades perquè la proteïna pugui interaccionar simultàniament amb més d'una.

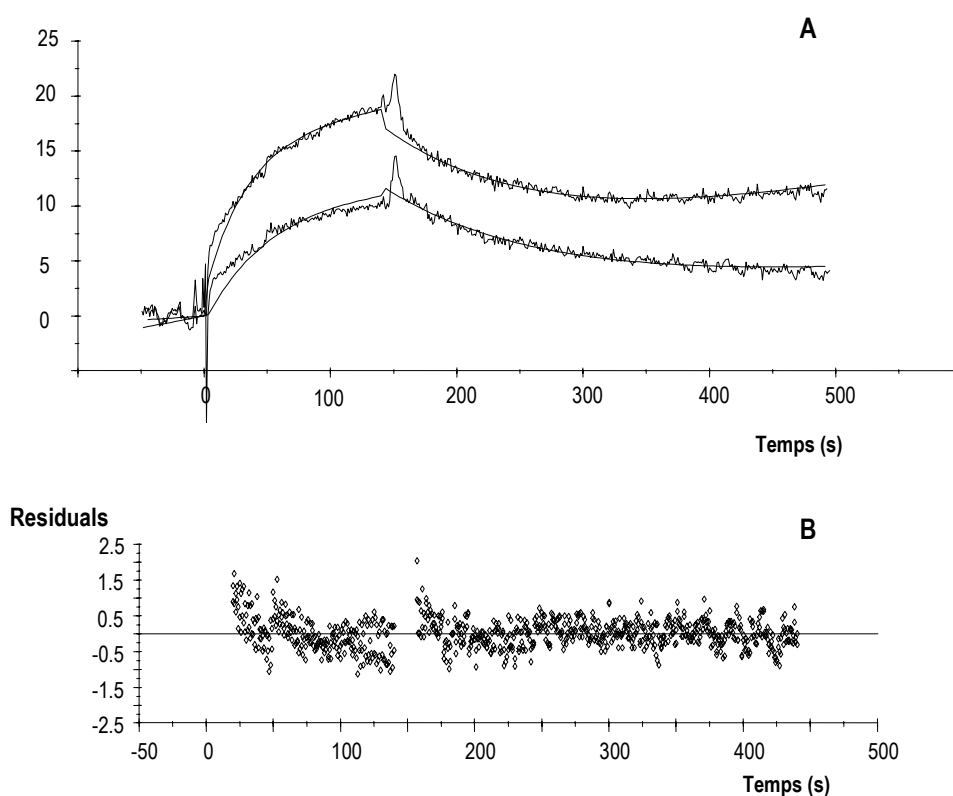


Figura 3.29 A- Superposició de les dades experimentals amb les corbes generades en l'ajust. B- Residuals.

Així, mitjançant aquests xips s'ha pogut determinar una  $K_D$  de l'ordre de  $0,1\mu\text{M}$ . De tota manera, tenint en compte que en el control negatiu s'ha pogut apreciar certa adsorció no específica sobre la superfície, és probable que aquest valor estigui una mica magnificat.

Tot i que s'ha pogut preparar amb èxit la superfície amb pèptid Candidat 4 immobilitzat, i s'ha pogut avaluar la interacció amb la p53\_tetS, s'ha descartat la utilització dels xips HPA en l'anàlisi degut a la baixa estabilitat que presenta la monocapa lipídica en les condicions d'anàlisi utilitzades.

### 3.2.4 CONCLUSIÓ

En aquest treball s'han explorat la majoria de superfícies disponibles en la tecnologia Biacore. Tot i els problemes trobats degut a la interacció no específica del Candidat 4 amb les superfícies basades en matrius de dextrà carboximetilat, finalment s'ha pogut comprovar que efectivament el pèptid Candidat 4 interacciona amb la p53\_tetS. De tota manera, degut a la baixa reproduïbilitat dels resultats obtinguts, ha semblat més convenient descartar la utilització d'aquesta tècnica en l'avaluació de la quimioteca de pèptids basats en el Candidat 4 que s'ha preparat.

Existeixen algunes superfícies més que no s'han explorat però que aparentment són poc prometedores. D'una banda hi ha els xips CM3, que com els CM5, contenen matrius de dextrà però més

curtes, i que en principi són més adequats per treballar amb analits voluminosos com són els virus o les cèl·lules. En els cas dels xips NTA, s'hi poden immobilitzar lligands amb cues d'histidina mitjançant quelació amb níquel, però la base d'aquests xips és la mateixa que la dels xips CM5. També hi ha els xips L1, els quals són molt similars als HPA i bàsicament es diferencien en que s'hi pot formar una bicapa lipídica en lloc d'una monocapa. Per últim, hi ha els xips Au, en els quals es té directament la làmina d'or i s'hi pot explorar la preparació de superfícies alternatives a les disponibles comercialment.

### 3.3 ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

Tal i com s'ha esmentat en el capítol 2 l'espectroscòpia de fluorescència ha estat àmpliament utilitzada per dur a terme estudis de reconeixement entre lligands i proteïnes, i per això s'ha decidit explorar la seva utilització en l'avaluació detallada de la interacció entre el Candidat 4 i la p53\_tetS.

Així doncs, les dades obtingudes en l'avaluació preliminar s'han ajustat a una  $K_D$  d'entre 0,8 i 10  $\mu\text{M}$  en funció de l'estequeometria considerada. Aquests resultats, però, no s'han pogut reproduir i quan s'ha tornat a avaluar la variació de la fluorescència d'una solució de Candidat 4 amb concentracions creixents de p53\_tetS en tampó fosfat 25mM pH 7, s'ha vist que pràcticament no es produïa cap variació. Inicialment s'ha cregut que hi havia un problema de degradació del pèptid i/o la proteïna, però s'ha comprovat que tots dos estaven en bon estat. S'han utilitzat diferents estocs de proteïna i de pèptid, així com diferents preparacions de tampó fosfat, obtenint-se en tots els casos una mínima variació de la fluorescència.

Un cop analitzats tots els resultats i els procediments utilitzats en la realització dels diferents experiments, sembla que l'explicació més probable a aquesta falta de reproduïbilitat és que el tampó utilitzat en les proves preliminars contenia una concentració errònia de fosfat. Així doncs, tot sembla indicar que en lloc de ser un tampó fosfat 25mM, en les avaluacions preliminars s'ha utilitzat tampó fosfat de més baixa concentració. Una altra possible explicació, podria ser que la mostra de p53\_tetS utilitzada en l'avaluació contingués alguna impuresa d'una substància capaç de produir un "quenching", com per exemple podria ser el iodur de potassi<sup>141</sup>.

L'anàlisi preliminar dels pèptids Candidat 2 i Candidat 4 s'ha realitzat amb el mateix tampó. Així doncs, aquestes dues anàlisis són comparables entre sí. A més a més, l'avaluació mitjançant Biacore utilitzant els xips HPA i les primeres anàlisis amb xips C1 en tampó fosfat, també s'han realitzat utilitzant el mateix estoc de tampó. Aquesta podria ser també una de les possibles explicacions de la falta de reproduïbilitat dels resultats obtinguts amb els xips C1, ja que en les anàlisis posteriors s'ha utilitzat una

---

<sup>141</sup> Fersht, A., "Structure and mechanism in protein science", Ed. Freeman, New York, 2002, p. 193

nova preparació de tampó fosfat 25mM que segurament contenia la concentració correcta de fosfat. D'altra banda, estudis recents han posat de manifest el concepte de "variabilitat de càrrega", fenomen que es pot produir quan compostos oligoguanidínics s'enfronten a solucions amb anions polidentats (com el fosfat). Segons aquest fenomen, per tal de disminuir la repulsió electroestàtica entre les càrregues positives dels diferents grups guanidini, algun d'aquests grups es complexen amb els anions disminuint així la càrrega aparent<sup>142</sup>. Aquesta complexació entre els fosfats i els grups guanidini, podria explicar la baixa afinitat observada a elevades concentracions de tampó fosfat.

Davant d'aquestes consideracions s'ha decidit avaluar la interacció entre el pèptid Candidat 4 i la p53\_tetS mitjançant espectroscòpia de fluorescència en aigua a pH 7.

### 3.3.1 AVALUACIÓ EN AIGUA A PH 7

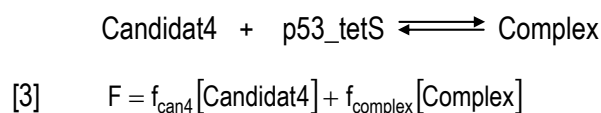
En addicionar petits volums d'una solució concentrada de p53\_tetS a una solució de Candidat 4 s'ha pogut observar una clara disminució de la intensitat de fluorescència.

Tenint en compte que la p53\_tetS té 4 motius tetraaniònic equivalents, l'estequeometria del complex Candidat 4:p53\_tetS pot arribar a ser de 4:1. L'ajust matemàtic mitjançant models amb aquestes estequeometries és força complicat, i per això per obtenir una estimació de la constant d'afinitat s'han ajustat les dades seguint el model 1:1 descrit a continuació:

#### Model matemàtic

Tot i que s'observa una clara disminució de la fluorescència del pèptid Candidat 4 en addicionar-hi la p53\_tetS, aquesta no arriba a ser mai nul·la. És per això, que a l'hora de dur a terme l'ajust de les dades experimentals s'ha de considerar tant la fluorescència del pèptid lliure com la fluorescència del pèptid complexat.

La fluorescència de cada espècie és proporcional a la seva concentració de manera que la fluorescència global en cada moment de la valoració es pot descriure segons l'equació [3]:



On  $f_{\text{can4}}$  i  $f_{\text{complex}}$  són les constants de proporcionalitat pel Candidat 4 i el Complex format, respectivament.

---

<sup>142</sup> Sakai, N. & Matile, S., *J. Am. Chem. Soc.*, (2003), **125**, 14348-14356

Si ara es consideren les concentracions totals de Candidat 4 i p53\_tetS ( $C_{\text{can4}}$  i  $C_{\text{p53\_tetS}}$ ) i la constant d'afinitat ( $K_A$ ):

$$C_{\text{can4}} = [\text{Candidat4}] + [\text{Complex}]$$

$$C_{\text{p53\_tetS}} = [\text{p53\_tetS}] + [\text{Complex}]$$

$$K_A = \frac{[\text{Complex}]}{[\text{Candidat4}][\text{p53\_tetS}]}$$

Mitjançant una reordenació es pot arribar a definir la fluorescència global en base a l'equació [4].

$$[4] \quad F = f_{\text{can4}} (C_{\text{can4}} - [\text{Complex}]) + f_{\text{complex}} [\text{Complex}]$$

on

$$[\text{Complex}] = \frac{(K_A C_{\text{can4}} + K_A C_{\text{p53\_tetS}} + 1) - \sqrt{(K_A C_{\text{can4}} + K_A C_{\text{p53\_tetS}} + 1)^2 - 4K_A^2 C_{\text{can4}} C_{\text{p53\_tetS}}}}{2K_A}$$

El fet de considerar les concentracions totals de Candidat 4 i de p53\_tetS, permet compensar els canvis de fluorescència deguts a la dilució de la mostra produïda al addicionar la p53\_tetS, ja que per a cada mesura s'ha calculat la concentració total de cada espècie.

Per obtenir la constant d'afinitat mitjançant aquest model, s'ha dut a terme un ajust iteratiu de les dades experimentals mitjançant l'equació [4]. Tenint en compte que inicialment tot el Candidat 4 està en forma lliure i que en presència d'un elevat excés de p53\_tetS està tot complexat, es poden utilitzar els següents valors de  $f_{\text{can4}}$  i  $f_{\text{complex}}$ :

$$f_{\text{can4}} = \frac{F_{\text{inicial}}}{C_{\text{can4}(\text{inicial})}}$$

$$f_{\text{complex}} = \frac{F_{\text{final}}}{C_{\text{can4}(\text{final})}}$$

Així doncs, en l'ajust s'han utilitzat les següents dades experimentals:

- variable dependent:  $y = F$
- variables independents:  $x = C_{\text{can4}}$ ,  $z = C_{\text{p53\_tetS}}$

I s'han ajustat els paràmetres  $K_A$ ,  $F_{\text{inicial}}$  i  $F_{\text{final}}$ .



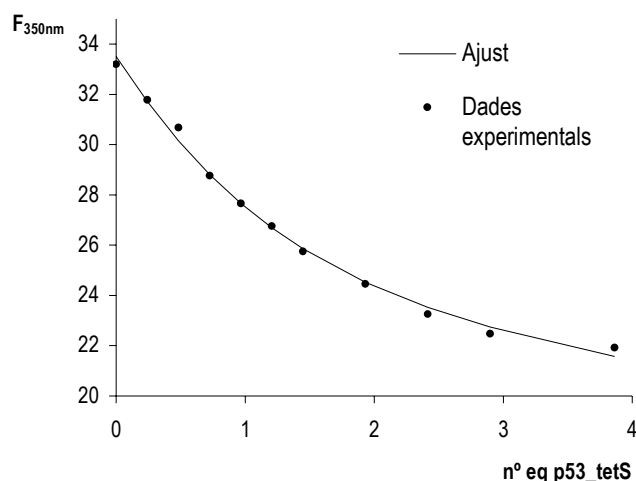
### Ajust de les dades experimentals

Per tal d'obtenir una estimació de la constant d'afinitat considerant diferents estequeometries s'han utilitzat tres aproximacions diferents: primerament, s'ha suposat la formació d'un complex Candidat 4:p53\_tetS d'estequeometria 1:1, de manera que en l'ajust com a  $C_{p53\_tetS}$  s'ha utilitzat la concentració de tetràmer. Com a segona aproximació, s'ha suposat la formació un complex 2:1 i s'ha utilitzat la concentració de dímer. Per últim s'ha utilitzat la concentració de monòmer de p53\_tetS, per tal d'obtenir una estimació de la constant d'afinitat d'un complex 4:1. Així doncs, s'han obtingut les estimacions de la constant d'afinitat recollides en la taula 3.3.

Estequeometria (Candidat 4:p53_tetS)	$K_A$ ( $M^{-1}$ )	$K_D$ ( $\mu M$ )	Chi <sup>2</sup>
1:1	$(4,0 \pm 0,9) \cdot 10^5$	$\approx 2,5$	0,08
2:1	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$\approx 8,4$	0,11
4:1	$(4,9 \pm 0,9) \cdot 10^4$	$\approx 20$	0,13

**Taula 3.3** Estimació de la constant d'afinitat en funció de l'estequeometria considerada.

En la comparació de les dades experimentals amb, per exemple, la corba obtinguda en l'ajust suposant una estequeometria 1:1, es pot veure com el model utilitzat és capaç de descriure força bé les dades experimentals (figura 3.30).



**Figura 3.30** Variació de la  $F_{350nm}$  d'una solució de Candidat 4  $3\mu M$  amb concentracions creixents de p53\_tetS en aigua a pH 7.

### 3.3.2 EXPERIMENTS DE COMPETICIÓ

Paral·lelament a l'avaluació de la interacció del pèptid Candidat 4 amb la p53\_tetS, en el grup s'ha estudiat la interacció del compost tetraguanidínic **1** (figura 3.31) amb la p53\_tetS<sup>143</sup>.

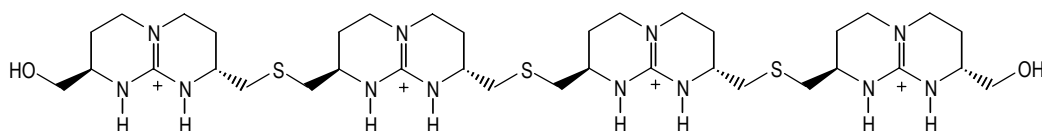


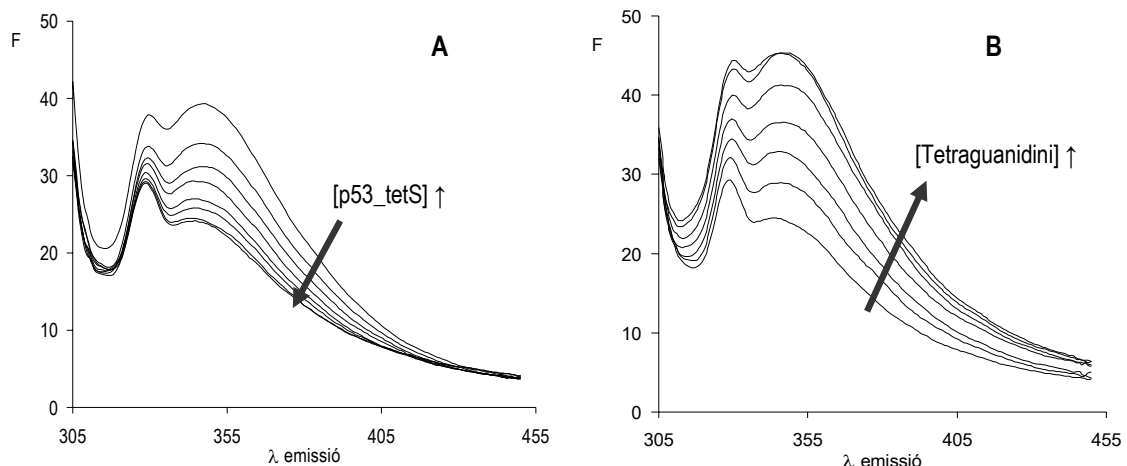
Figura 3.31 Compost tetraguanidínic **1**

Aquests estudis s'han dut a terme en aigua a pH 7, i mitjançant diferents tècniques de RMN s'ha pogut demostrar que el compost tetraguanidínic interacciona amb la p53\_tetS amb una  $K_D$  d'entre 210 i 50  $\mu$ M. En aquests estudis, també s'ha pogut comprovar que el compost tetraguanidínic interacciona amb la zona rica en carboxilats de la superfície de la p53\_tetS formada pels residus E336, E339, E343, E346, E349 i D352.

En el present treball, s'ha decidit estudiar la interacció del compost tetraguanidínic i el pèptid Candidat 4 amb la p53\_tetS mitjançant experiments de competició. Així doncs, aprofitant que el compost tetraguanidínic no és una espècie fluorescent en les condicions de treball utilitzades, s'ha comprovat si es produeix una recuperació de la fluorescència si s'addiciona el compost tetraguanidínic sobre una solució de pèptid Candidat 4 saturada amb p53\_tetS. L'objectiu d'aquests experiments és doble, ja que d'una banda s'ha buscat posar a punt algun mètode que en un futur permeti estudiar la interacció de lligands no fluorescents amb la p53\_tetS, i de l'altra s'ha volgut comprovar per una tècnica diferent a la RMN si el pèptid Candidat 4 i el compost tetraguanidínic reconeixen la mateixa zona de la superfície de la p53\_tetS.

Efectivament, s'ha pogut observar com es produeix una recuperació de la fluorescència quan s'addiciona el compost tetraguanidínic sobre una solució de Candidat 4 amb concentracions saturants de p53\_tetS (figura 3.32). En els espectres de fluorescència es pot observar que la intensitat al final de l'estudi de competició és lleugerament superior a la inicial. Aquest fet, es deu que en aquestes condicions, degut a el gran excés de p53\_tetS, a la fluorescència global hi ha una lleugera contribució de les seves tirosines.

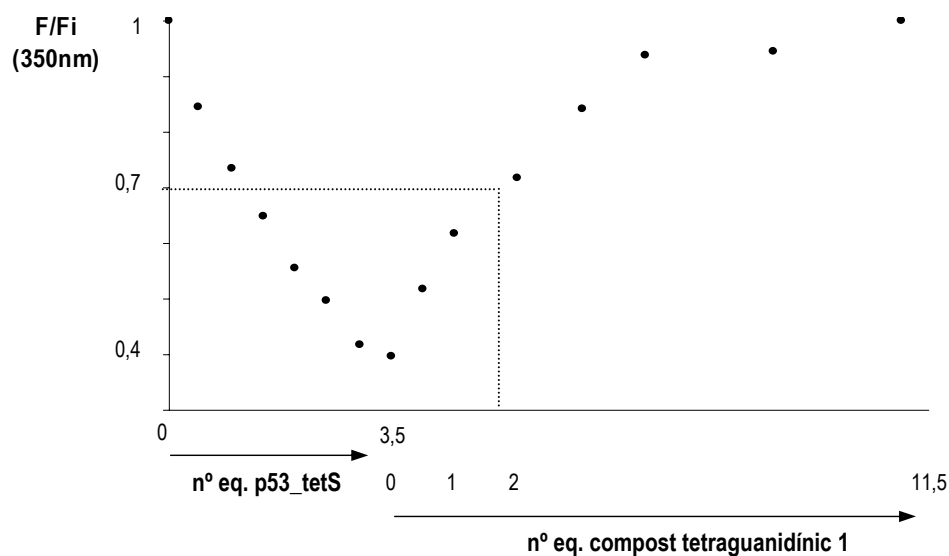
<sup>143</sup> Salvatella, X., Martinell, M., Gairí, M., Mateu, M.G., Feliz, M., Hamilton, A.D., de Mendoza, J. & Giralt, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2004), **43**, 196-198



**Figura 3.32** A- Espectres de fluorescència d'una solució de Candidat 4 amb concentracions creixents de p53\_tetS en aigua a pH 7. B- Espectres de fluorescència corresponents a l'addició de quantitats creixents del compost tetraguanidínic sobre la solució anterior.

Aquest resultat suggereix que el compost tetraguanidínic desplaça al Candidat 4, confirmant així que ambdós productes reconeixen la mateixa zona de la superfície de la p53\_tetS.

Qualitativament, es pot pensar que si el compost tetraguanidínic tingués la mateixa afinitat que el pèptid Candidat 4, en quantitats equimolars dels dos productes s'hauria d'observar una recuperació d'aproximadament el 50% de la fluorescència. En la figura 3.33 es pot comprovar com la recuperació del 50% de la fluorescència no es dona fins quasi els dos equivalents de compost tetraguanidínic. Aquest fet, suggereix que l'afinitat del pèptid Candidat 4 és lleugerament superior a la del compost tetraguanidínic 1.



**Figura 3.33** Variació de la intensitat de fluorescència a 350nm al llarg de l'experiment de competició. En aquest gràfic s'ha corregit el lleuger increment de fluorescència degut a les tirosines de la p53\_tetS.

### 3.3.3 CONCLUSIÓ

Així doncs, d'aquests estudis de fluorescència se'n pot concloure que el pèptid Candidat 4 interacciona amb el domini de tetramerització de la p53 amb una  $K_D$  d'entre 2 i 20  $\mu\text{M}$  en aigua i a pH neutre. A més a més, és de destacar que aquesta afinitat és superior a la trobada pel compost tetraguanidínic 1.

## 3.4 MICROCALORIMETRIA

Mitjançant una valoració calorimètrica isotèrmica (ITC, "isothermal titration calorimetry"), es pot estudiar la calor que es desprèn o s'absorbeix en un procés de reconeixement entre dues o més molècules. Aquest fenomen ha estat àmpliament utilitzat en l'estudi de processos de reconeixement<sup>144</sup>, incloent-hi estudis d'interacció lligand-proteïna<sup>145</sup>. En general, en aquests experiments, a una solució de proteïna s'hi van addicionant petites quantitats de lligand i es va mesurant la calor després o absorbida en cada addició. La calor observada va disminuint progressivament fins que la proteïna està completament saturada, moment a partir del qual només s'observa la corresponent calor de dilució.

La gran avantatge d'aquesta tècnica és que té una gran aplicabilitat, ja que en la majoria dels processos fisicoquímics es produeix alguna variació de calor. A més a més, amb aquesta tècnica l'estudi de la interacció es fa en solució, no és necessari cap mena de marcatge i no hi ha limitacions en el tamany ni de la proteïna ni del lligand. Per últim, mitjançant aquesta tècnica s'obté una descripció termodinàmica completa del procés de reconeixement de manera que amb una sola valoració es pot obtenir la constant d'afinitat ( $K_A$ ), l'estequeometria del complex ( $n$ ) i les variacions d'entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) i d'entropia ( $\Delta S^\circ$ ) del procés.

Per contra, amb aquesta tècnica no s'obté informació cinètica del procés de reconeixement. A més a més, en els casos d'interaccions amb afinitats moderades o febles es necessita una quantitat molt elevada de mostra.

En aquest treball, s'ha decidit utilitzar l'ITC per avaluar la interacció del pèptid Candidat 4 amb la p53\_tetS. L'objectiu d'aquest estudi és aprofundir en la comprensió d'aquest procés de reconeixement, però s'ha descartat com a mètode per avaluar tota la quimioteca de pèptids degut a l'elevada quantitat de mostra que es necessita.

---

<sup>144</sup> Ward, W.H. & Holdgate, G.A., *Prog. Med. Chem.*, (2001), **38**, 309-376

<sup>145</sup> Leavitt, S. & Freire, E., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (2001), **11**, 560-566

Aquests estudis s'han realitzat mitjançant una curta estada al laboratori de la Dra. Margarita Menéndez al "Instituto de Química Física Rocasolano" del CSIC a Madrid.

### 3.4.1 FONAMENT DE LA TÈCNICA

En la instrumentació utilitzada en aquest treball es disposen de dues cel·les, una amb la mostra i una altra de referència. Entre les dues cel·les es manté constant una lleugera diferència de temperatura mitjançant l'aplicació d'un corrent constant a la cel·la de referència i un corrent variable de compensació ("feedback") a la cel·la de mostra (figura 3.34)<sup>146</sup>. Quan s'addiciona el lligand a la cel·la amb la mostra, si es produeix interacció, varia la temperatura de la cel·la. El calorímetre, detecta aquesta variació en la temperatura i ajusta el corrent de compensació de la cel·la de mostra per a tal que se segueixi mantenint la mateixa diferència de temperatura respecte la cel·la de referència. Així, les reaccions exotèrmiques provoquen una disminució en el corrent de compensació i les reaccions endotèrmiques provoquen un augment en el corrent de compensació. El sistema enregistra contínuament aquest corrent de compensació, de manera que de la integració de les seves fluctuacions se n'obté la calor despresa o absorbida en el procés de reconeixement.

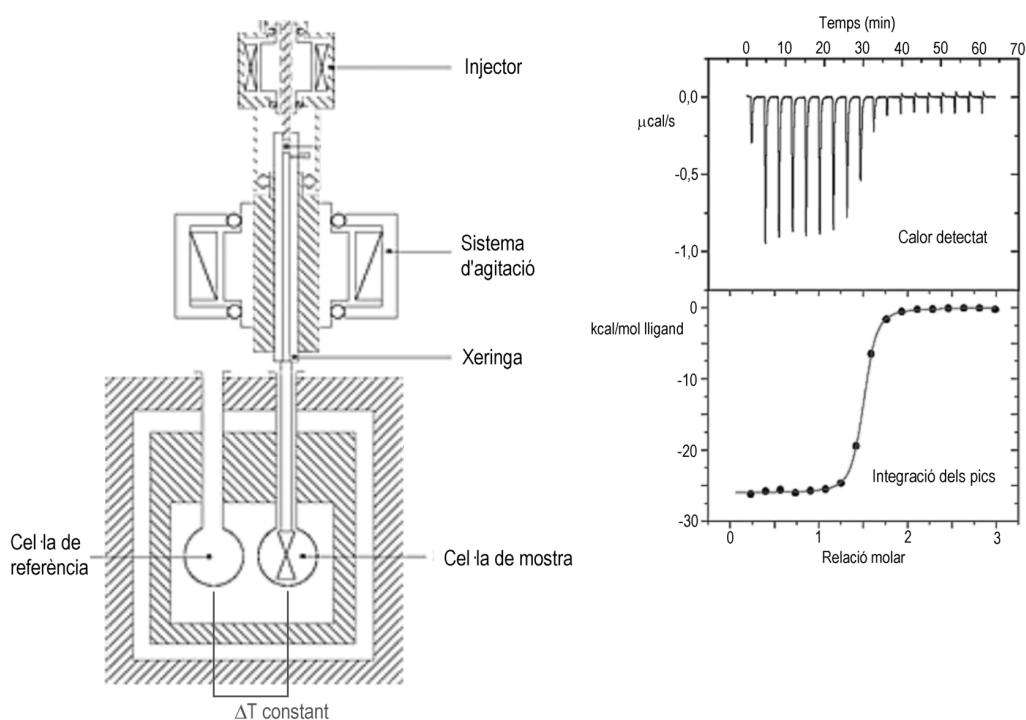
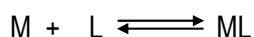


Figura 3.34 Esquema del calorímetre utilitzat i de les dades que s'obtenen.

<sup>146</sup> <http://www.microcalorimetry.com>

Si es considera un procés de reconeixement entre un lligand (L) i una macromolècula (M), la constant d'afinitat ve definida per l'equació [5]. Aquesta constant normalment es determina a partir de variacions en la concentració de complex en funció de la concentració de lligand. A partir de la constant es pot obtenir el valor de l'energia lliure de Gibbs mitjançant l'equació [6]. Tenint en compte aquestes equacions, utilitzant la relació de van't Hoff [7] es pot obtenir la variació d'entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) si es disposa del valor de la constant d'afinitat a diferents temperatures<sup>147</sup>.



$$[5] \quad K_A = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

$$[6] \quad \Delta G^\circ = -RT \ln K_A = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

$$[7] \quad \frac{d(\ln K_A)}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H^\circ}{R}$$

El problema d'obtenir dades termodinàmiques mitjançant aquest tipus d'aproximació, és que hi ha un elevat error degut a la dificultat d'obtenir dades prou precises a un rang ampli de temperatures. Mitjançant les tècniques calorimètriques, a partir de la calor involucrada en el procés de reconeixement s'obté directament el valor de  $\Delta H^\circ$ , essent així un valor molt més fiable.

En una valoració calorimètrica, a cada injecció la calor despresa o absorbida és proporcional a la variació en la concentració de lligand unit [8]<sup>148</sup>.

$$[8] \quad q = V \cdot \Delta H^\circ \cdot \Delta [L_{\text{unit}}]$$

On V és el volum total.

La calor acumulada (Q) es pot expressar en funció de la concentració de lligand total ( $L_{\text{total}}$ ), de manera que s'obté una relació a partir de la qual, mitjançant un ajust iteratiu, es pot estimar la constant d'afinitat ( $K_A$ ), la variació d'entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) i l'estequeometria (n) [9].

<sup>147</sup> Eftink, M. & Biltonen, R., "Biological Microcalorimetry", Ed. Academic Press, 1980, pp.346-351

<sup>148</sup> Holdgate, G.A., *BioTechniques*, (2001), **31**, 164-184

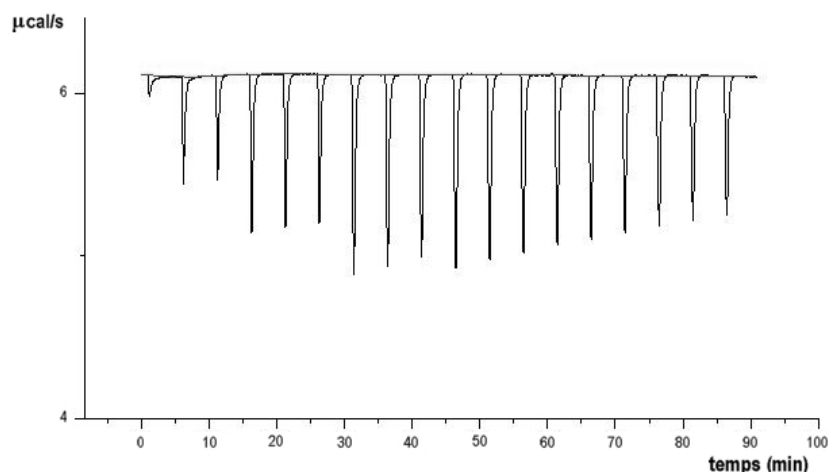
$$[9] \quad Q = \frac{(1 + [M_{\text{total}}] \cdot n \cdot K_A + K_A \cdot [L_{\text{total}}]) - \sqrt{[(1 + [M_{\text{total}}] \cdot n \cdot K_A + K_A \cdot [L_{\text{total}}])^2 - 4 \cdot [M_{\text{total}}] \cdot n \cdot K_A^2 \cdot [L_{\text{total}}]}}{2 \cdot K_A / V \cdot \Delta H^\circ}$$

Finalment, a partir de l'equació [6] es pot obtenir el valor de  $\Delta G^\circ$  i  $\Delta S^\circ$ .

S'ha de reconèixer que amb aquesta metodologia s'està molt subjecte al errors provocats per altres fonts de calor. Així, per minimitzar el calor de mescla de les dues solucions, tant la proteïna com el lligand han d'estar dissolts en el mateix dissolvent. Pel que fa a la calor de dilució de la proteïna, normalment és negligible ja que la variació de concentració que es produeix en cada addició és mínima. No passa el mateix amb la calor de dilució del lligand, ja que la concentració inicial és nul·la i aquest s'addiciona mitjançant petits volums d'una solució d'elevada concentració. Per compensar aquest efecte, s'ha de realitzar un blanc en el qual es faci la valoració sobre una solució sense proteïna. Les calors obtingudes en aquest blanc es resten de les obtingudes en la valoració en presència de proteïna. Així, es poden obtenir mesures amb un elevat grau de fiabilitat.

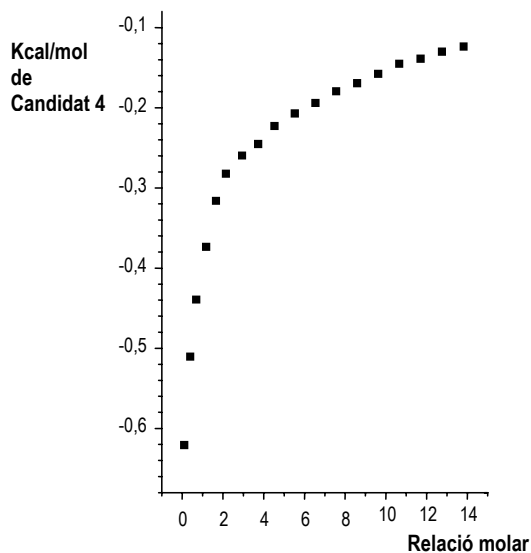
### 3.4.2 EXPERIMENTS REALITZATS

La interacció del pèptid Candidat 4 amb la p53\_tetS, s'ha avaluat mitjançant ITC en aigua a pH 7 i a 25°C. Així, s'ha valorat una solució de p53\_tetS 50µM i s'ha pogut observar com el procés de reconeixement entre la p53\_tetS i el Candidat 4 és de caràcter exotèrmic (figura 3.35).



**Figura 3.35** Calor despresa durant la valoració realitzada amb Candidat 4 sobre una mostra de p53\_tetS 50µM en H<sub>2</sub>O, pH 7 i 25°C.

En realitzar el blanc, s'ha observat que la calor de dilució del pèptid és força elevada, de manera que per dur a terme l'anàlisi de les dades ha estat especialment important restar les calors de dilució obtingudes en aquest blanc (figura 3.36).



**Figura 3.36** Corba resultant un cop restat el blanc.

Les dades obtingudes s'han intentat ajustar a diversos models considerant diferents estequeometries i diferents tipus de punts d'unió. Els models que han donat millors ajustos, són aquells que consideren diversos punts d'unió seqüencials, és a dir diferents regions de la proteïna que cada vegada van tenint una menor afinitat (taula 3.4). Per contra, els models basats en punts d'unió independents, han donat ajustos molt dolents.



Model	n=4		n=3		n=2	
Punts d'unió seqüencials	$K_A(M^{-1})$	$\Delta H^\circ$ (cal/mol)	$K_A(M^{-1})$	$\Delta H^\circ$ (cal/mol)	$K_A(M^{-1})$	$\Delta H^\circ$ (cal/mol)
1	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$-690 \pm 23$	$(3 \pm 1) \times 10^4$	$-1000 \pm 200$	$(8 \pm 3) \times 10^4$	$-640 \pm 60$
2	$(6 \pm 1) \times 10^4$	$-110 \pm 30$	$(2.4 \pm 0.7) \times 10^4$	$100 \pm 200$	$600 \pm 80$	$-9000 \pm 1000$
3	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^4$	$-800 \pm 100$	$950 \pm 90$	$-6400 \pm 400$		
4	$490 \pm 60$	$-8400 \pm 700$				
Chi <sup>2</sup>	4.70		19.8		81.4	

Model	n=4		n=3		n=2	
Punts d'unió independents	$K_A(M^{-1})$	$\Delta H^\circ$ (cal/mol)	$K_A(M^{-1})$	$\Delta H^\circ$ (cal/mol)	$K_A(M^{-1})$	$\Delta H^\circ$ (cal/mol)
1	$(2 \pm 2) \times 10^4$	$-700 \pm 500$	$(9 \pm 5) \times 10^4$	$-580 \pm 50$	$(8 \pm 4) \times 10^4$	$-570 \pm 50$
2	$7 \pm 660$	$-203 \times 10^3$	$600 \pm 100$	$-4400 \pm 300$	$600 \pm 100$	$-9000 \pm 1000$
	N1=2		N1=1		N1=1	
	N2=2		N2=2		N2=1	
Chi <sup>2</sup>	640		81		82	

1	$(9 \pm 4) \times 10^4$	$-580 \pm 50$
2	$700 \pm 100$	$-2900 \pm 300$
	N1=1	
	N2=3	
Chi <sup>2</sup>	80.7	

**Taula 3.4** - Taula amb el resum del resultat obtingut en l'ajust utilitzant diferents models.

En totes els casos, en l'ajust s'ha utilitzat la concentració dels possibles punts d'unió, és a dir, la concentració de monòmer.

### 3.4.3 CONCLUSIÓ

Des d'un punt de vista qualitatiu, aquest resultat d'una banda confirma la interacció entre el pèptid Candidat 4 i la p53\_tetS i de l'altra, suggereix que els quatre motius aniònics que hi ha en la superfície del tetràmer no són equivalents. Tenint en compte la geometria de la p53\_tetS, els quatre motius haurien de ser equivalents, de manera que l'explicació més probable a aquesta disminució progressiva de l'afinitat la trobem en el fet que la complexació de cada unitat de Candidat 4 afecta a la incorporació de la següent, sigui per impediment estèric o per efectes al·lostèrics.

D'entre els models seqüencials, el que ha donat millor resultat és el de quatre punts d'unió. En aquest model els dos primers punts tenen una afinitat força elevada amb un valor de  $K_D$  d'aproximadament  $10\mu\text{M}$ . El tercer punt té una afinitat pràcticament un ordre de magnitud més baixa i el quart ja té una afinitat de l'ordre de  $2\text{mM}$ . Malgrat que coincideix amb el nombre de punts d'unió de la p53\_tetS, s'ha de dir que en la utilització d'un model amb quatre punts d'unió seqüencials s'ajusten molts paràmetres, i això facilita que les dades s'ajustin bé encara que el model físicament no sigui el més correcte.

Tenint en compte la simetria de la p53\_tetS, sembla més lògic ajustar les dades a un model que defineixi dos tipus de punts d'unió: uns d'elevada afinitat i uns de baixa afinitat. En el model de tres punts seqüencials, es té aquesta situació ja que els dos primers punts d'unió tenen una afinitat similar ( $K_d \approx 30$  i  $40\mu\text{M}$ ) i el tercer té una afinitat quasi dos ordres de magnitud menor ( $K_d \approx 1\text{mM}$ ). Tenint en compte el nombre d'equivalents de pèptid que s'han addicionat els punts d'unió de baixa afinitat tot just s'han començat a saturar i per això només podem ajustar fins a tres punts d'unió. Si s'haguessin afegit més equivalents de pèptid, probablement s'haurien pogut ajustar les dades a un quart punt d'unió amb una afinitat similar a la del tercer. Tot i això, veient els valors d'entalpia obtinguts amb aquest model semblen una mica contradictoris, ja que per les dues zones d'elevada afinitat s'obtenen valors de signe oposat.

En conclusió, l'únic que sembla poder-se assegurar és que el pèptid Candidat 4 interacciona amb al p53\_tetS en diversos punts no equivalents, podent-se diferenciar dos tipus de punts d'unió, uns amb una afinitat moderada ( $K_d \approx 10\mu\text{M}$ ) i uns amb una afinitat baixa ( $K_d \approx 1\text{mM}$ ).

Pel que fa als valors de variació d'entalpia i d'entropia, sembla que el procés de reconeixement entre el Candidat 4 i la p53\_tetS està dominat per la variació d'entropia, ja que en general s'obtenen uns valors de  $\Delta H^\circ$  que ronden les  $-0,8\text{Kcal/mol}$  i uns valors de  $-T\Delta S^\circ$  que ronden les  $-5\text{Kcal/mol}$ . Aquest resultat és força lògica, ja que la interacció entre lligands carregats i macromolècules amb càrrega de signe contrari, en la majoria dels casos està dominada per l'augment de l'entropia com a conseqüència de l'alliberament de les aigües d'hidratació i contraions que envolten els grups carregats en les espècies

lliures<sup>149</sup>. A més a més, la utilització d'un lligand com el Candidat 4 el qual des del punt de vista de les interaccions electrostàtiques es pot considerar com a tetravalent, encara afavoreix més l'augment d'entropia com a conseqüència de l'efecte quelant.

## 3.5 DISCUSSIÓ

### p53 tetS i Candidat 4

Les dues principals conclusions que es poden extreure de tots aquests estudis de reconeixement, són d'una banda que el Candidat 4 interacciona amb la p53\_tetS amb una estequiometria pèptid:proteïna de  $n:1$  on  $n > 1$ , i de l'altra que l'afinitat disminueix a mesura que s'hi van incorporant noves unitats de pèptid.

Així, doncs s'han pogut diferenciar dos tipus de constants, unes d'elevada afinitat i unes altres de baixa afinitat. En el model que sembla que encaixa millor amb totes les dades experimentals, la p53\_tetS pot interaccionar amb fins a 4 unitats de pèptid Candidat 4. Pel que fa a l'afinitat, sembla que és elevada per a les dues primeres unitats i força baixa per a les següents.

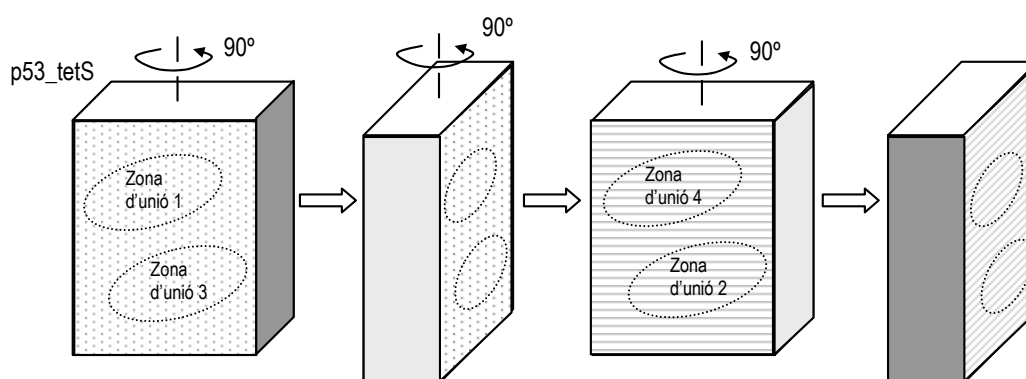
El valor de la constant d'elevada afinitat s'ha pogut determinar mitjançant dues tècniques independents, com són l'espectroscòpia de fluorescència i la valoració calorimètrica isotèrmica, en aigua a pH 7. Mitjançant ambdues tècniques s'ha obtingut una  $K_D$  de l'ordre de  $10\mu\text{M}$ .

Pel que fa a la constant de baixa afinitat, només es pot determinar mitjançant tècniques en les quals el component en excés sigui el pèptid. Així doncs, mitjançant ITC, s'ha pogut determinar que aquesta  $K_D$  és de l'orde de  $1\text{mM}$ .

Les dades de RMN han permès comprovar que el pèptid interacciona amb la zona rica en carboxilats de la superfície de la p53\_tetS, però també semblen indicar que cada unitat de pèptid no interacciona simultàniament amb els residus E343, E346, E349 i D352 d'un mateix monòmer, sinó que ho fa amb residus dels diferents monòmers. Així doncs, a partir d'aquests resultats, sembla que es poden delimitar 4 zones d'unió, dues en cada costat de la proteïna (figura 3.37).

---

<sup>149</sup> Eftink, M. & Biltonen, R., "Biological Microcalorimetry", Ed. Academic Press, 1980, p. 371



**Figura 3.37** Esquema representatiu de la p53 amb forma de paral·lelepípede. Les quatre possibles zones d'unió es troben numerades seqüencialment segons l'ordre hipotètic d'afinitat.

Pel que fa a les constants d'afinitat, sembla lògic pensar que la primera unitat de pèptid s'uneix a una cara de la proteïna, i la següent unitat s'uneix a la cara oposada. Així la tercera unitat de pèptid, es troba que a la zona d'unió hi ha un altre pèptid molt proper, que pot ser que provoqui certs impediments probablement de tipus estèric, que en dificultin el reconeixement. El que seria la quarta unitat de pèptid, es troba en una situació similar però pel costat oposat.

Per últim, aquests resultats indiquen que aquests tipus de lligands també poden ser utilitzats en el reconeixement d'altres superfícies riques en carboxilats encara que aquests no estiguin distribuïts en una periodicitat de  $i / i+3$ .

#### Candidat 4 vs. compost tetraguanidínic

S'ha de destacar que si es compara el valor de la  $K_D$  del compost tetraguanidínic **1** amb el del pèptid Candidat 4, es pot concloure que mitjançant la utilització d'un pèptid amb quatre arginines distribuïdes en una periodicitat de  $i / i+2$  s'ha pogut obtenir un lligand amb una afinitat superior a la del compost tetraguanidínic. Aquest augment d'afinitat, també s'ha pogut comprovar mitjançant experiments de competició.

Si es compara el pèptid Candidat 4 i el compost tetraguanidínic, una de les principals diferències és que el pèptid té una flexibilitat molt superior. Aquesta major flexibilitat, pot ser la raó per la qual l'afinitat augmenta, ja que aquesta li permet adaptar-se molt millor a la superfície de la proteïna.

Quan es considera la superfície d'una proteïna, és molt important no imaginar-la com una àrea immòbil en la qual la posició dels àtoms està fixada, sinó com una àrea molt dinàmica i d'elevada plasticitat. Aquesta elevada mobilitat, permet que la proteïna es pugui adaptar a lligands força rígids com el compost tetraguanidínic, tot i que sovint el cost energètic d'aquesta adaptació és molt gran. En aquest

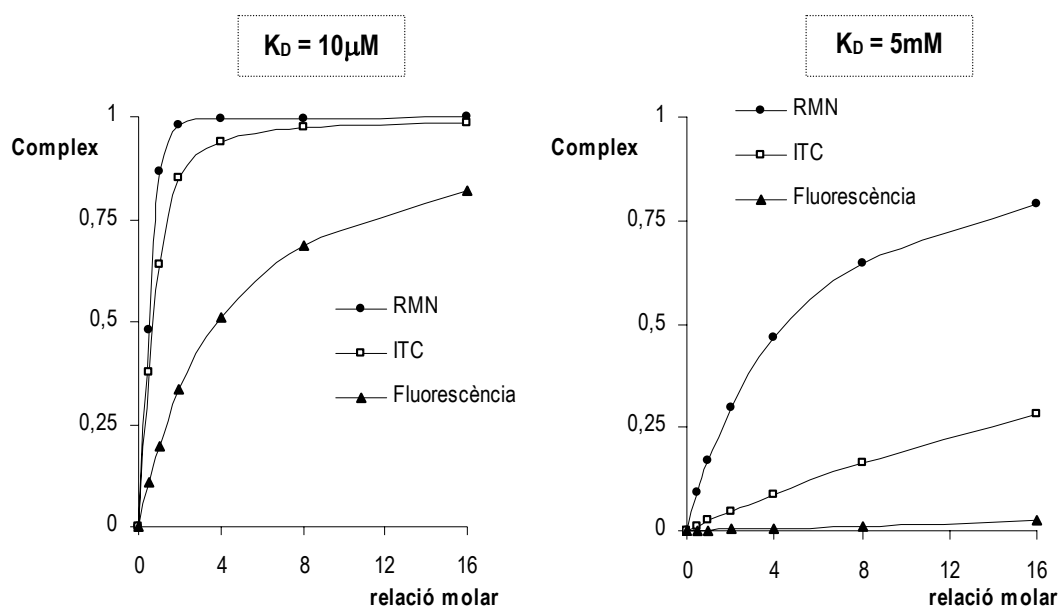
sentit, sembla més adient utilitzar lligands com el pèptid Candidat 4, els quals per si sols es poden adaptar a les superfícies mòbils i canviants de les proteïnes.

El resultat presentat en aquest treball, sembla corroborar aquesta idea, tot i que no s'ha d'oblidar que l'augment d'afinitat també pot ser degut a la contribució d'alguna altra part del pèptid.

### Metodologia

A partir dels resultats obtinguts amb les diferents tècniques s'ha obtingut una informació complementària. Així, a partir de les dades de ressonància magnètica nuclear s'ha pogut determinar la especificitat de la interacció i la zona de la proteïna involucrada en el procés de reconeixement. En canvi, a partir de les dades obtingudes mitjançant espectroscòpia de fluorescència i valoració calorimètrica isotèrmica s'ha pogut obtenir un valor força acurat de les constants d'afinitat involucrades en aquest procés de reconeixement.

S'ha de destacar que la informació que es pot obtenir a partir de cadascuna de les tècniques utilitzades és diferent gràcies al rang de concentracions en el que es treballa. Així si es compara qualitativament com evoluciona la formació d'un complex 1:1 en funció de la  $K_D$  en les concentracions utilitzades en les diferents metodologies es pot veure que aquesta és força diferent (figura 3.38).



**Figura 3.38** Corbes teòriques representatives de la formació d'un complex 1:1 en funció de la relació molar, per a dues constants d'afinitat i considerant el rang de concentracions utilitzat en les tècniques de fluorescència ( $3\mu\text{M}$ ), ITC ( $50\mu\text{M}$ ) i RMN ( $500\mu\text{M}$ ).

En el rang de concentracions dels experiments  $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC, es pot veure com per a la constant d'elevada afinitat s'arriba ràpidament a la saturació. Pel que fa a la constant de baixa afinitat, amb 16 equivalents d'excés d'un dels components, tot i que no s'arriba a la saturació, aquesta és clarament detectable. Si es comprova què passa en el rang de concentracions utilitzat en l'ITC, es pot veure que també s'assoleix una clara saturació quan es té una  $K_D$  de l'orde de  $10\mu\text{M}$ , però en canvi amb el excessos utilitzats només es pot detectar la part inicial de la corba de la constant de baixa afinitat. Finalment, en el cas de l'espectroscòpia de fluorescència, només es pot detectar la constant d'elevada afinitat, i de fet, no s'arriba ni a la saturació.

Si es planteja l'opció de sintetitzar una quimioteca de pèptids per tal d'optimitzar l'afinitat del pèptid Candidat 4, la tècnica que sembla més adient per tal de dur a terme l'avaluació d'aquesta quimioteca és la fluorescència. Això és així, perquè en l'anàlisi de la quimioteca és convenient utilitzar una tècnica que permeti diferenciar lleugeres variacions en l'afinitat. En el rang de concentracions utilitzat en la RMN i l'ITC, s'assoleix massa ràpidament la saturació i això dificulta la distinció de petits canvis d'afinitat. A més a més, tant en la RMN com en l'ITC la quantitat de mostra necessària és molt superior.

Així doncs, com a metodologia d'avaluació de la futura quimioteca de pèptids s'ha escollit l'espectroscòpia de fluorescència.



