

APÈNDIX

PREPARACIÓ D'ANTICOSSOS DIRIGITS A LA P53_TETS

Per tal de poder realitzar diferents tipus d'estudi de reconeixement de la p53_tetS, s'han preparat anticossos dirigits a diferents zones de la proteïna. L'obtenció d'aquests anticossos s'ha dut a terme mitjançant l'inoculació en conills dels pèptids corresponents a les diferents zones de la proteïna. A continuació es descriu breument el procediment utilitzat¹⁹⁴.

Elecció de les seqüències

L'objectiu d'aquest treball ha estat aconseguir dos anticossos diferents de la p53_tetS. En primer lloc s'ha buscat obtenir un anticòs per a la zona de la proteïna on hi ha el motiu tetraaniònic format pels residus E343, E346, E349 i D352. En segon lloc, s'ha buscat obtenir un anticòs per a una de les zones de la proteïna més allunyades del motiu tetraaniònic.

L'elecció exacta de les seqüències s'ha fet en base el perfil d'hidrofobicitat obtingut a partir dels paràmetres de Hopp & Woods¹⁹⁵. Així doncs, finalment s'han escollit els pèptids corresponents als fragments 311-324 (p1-14) i 341-354 (p-hèlix) (figura Apèndix.1).

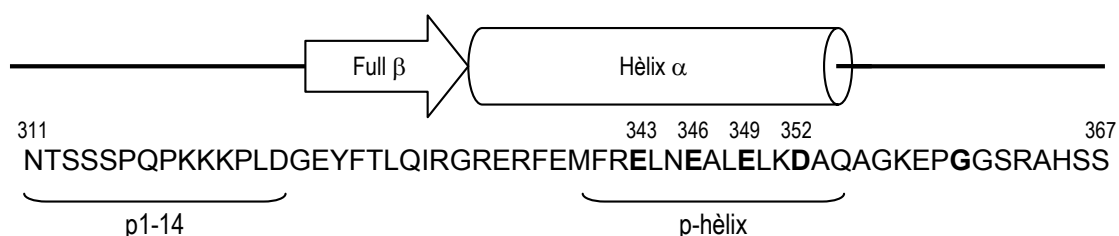


Figura Apèndix.1 Representació dels pèptids escollits per a l'obtenció d'anticossos de p53_tetS.

Síntesi dels pèptids

Per tal de poder immobilitzar el pèptid en una columna d'afinitat i poder-lo conjuguar a la proteïna KLH, s'han sintetitzat els pèptids afegint-hi una cisteïna en l'extrem C-terminal. Així doncs s'han sintetitzat els següents pèptids:

¹⁹⁴ Valero, M.L., Tesi doctoral, (1997), Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona

¹⁹⁵ Hopp, T.P. & Woods, K.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1981), **78**, 3824-3828 (<http://www.us.expasy.org>)

- **p1-14:** H-NTSSSPQPKKKPLDC-NH₂
- **p-hèlix:** Ac-FRELNEALELKDAQC-NH₂

El pèptid p1-14 s'ha obtingut mitjançant síntesi automàtica seguint una estratègia Boc/Bzl. En el cas del pèptid p-hèlix, la qualitat del cru ha estat massa baixa i s'ha repetit la síntesi manualment.

En ambdós casos s'ha obtingut un pèptid de prou puresa per tal de realitzar directament la conjugació a KLH. Aquesta conjugació és necessària per tal d'augmentar la immunogenicitat del pèptid, ja que si als conills se'ls hi injectés directament un pèptid de només 15 aminoàcids, aquest pràcticament no produiria cap mena de resposta immune.

Conjugació a KLH

Per dur a terme la conjugació de cadascun dels pèptids, s'ha tractat una alíquota de 10mg de KLH dissolta en tampó PBS amb una dissolució de 3-maleïmidobenzoat de *N*-hidroxisuccinimida (MBS) i se n'ha separat l'adducte de KLH i MBS mitjançant filtració molecular amb una columna Sephadex G-25. Finalment, les fraccions amb l'adducte s'han addicionat sobre 10mg de pèptid liofilitzat, s'ha ajustat el pH a 7,4 i s'ha deixat reaccionar durant 3h. Passat aquest temps, la solució resultant s'ha dialitzat en front de tampó carbonat amònic 10mM pH 8.

El grau de conjugació s'ha determinat mitjançant anàlisi d'aminoàcids, trobant-se en ambdós casos al voltant de 2500-2600 mols de pèptid per mol de KLH.

Generació dels anticossos

La generació dels anticossos s'ha realitzat mitjançant inoculacions periòdiques de cadascun dels conjugats a dos conills diferents durant tres mesos¹⁹⁶. En cada inoculació s'ha injectat 200µg de pèptid. Passat aquest temps, s'han extret uns 40ml de sang a cadascun dels quatre conills, s'han centrifugat i s'han conservat els sèrums resultants a -20°C.

Durant aquests mesos s'han anat fent també petites extraccions de sang periòdiques per tal de comprovar que s'estaven generant els corresponents anticossos.

Mitjançant una anàlisi ELISA s'ha pogut comprovar que efectivament s'han obtingut anticossos capaços de reconèixer tant la p53_tetS com els fragments peptídics utilitzats per a la seva generació (figura Apèndix.2).

¹⁹⁶ Procediment realitzat per la Dra. Josefina Casas en l'estabulari del CID a Barcelona.

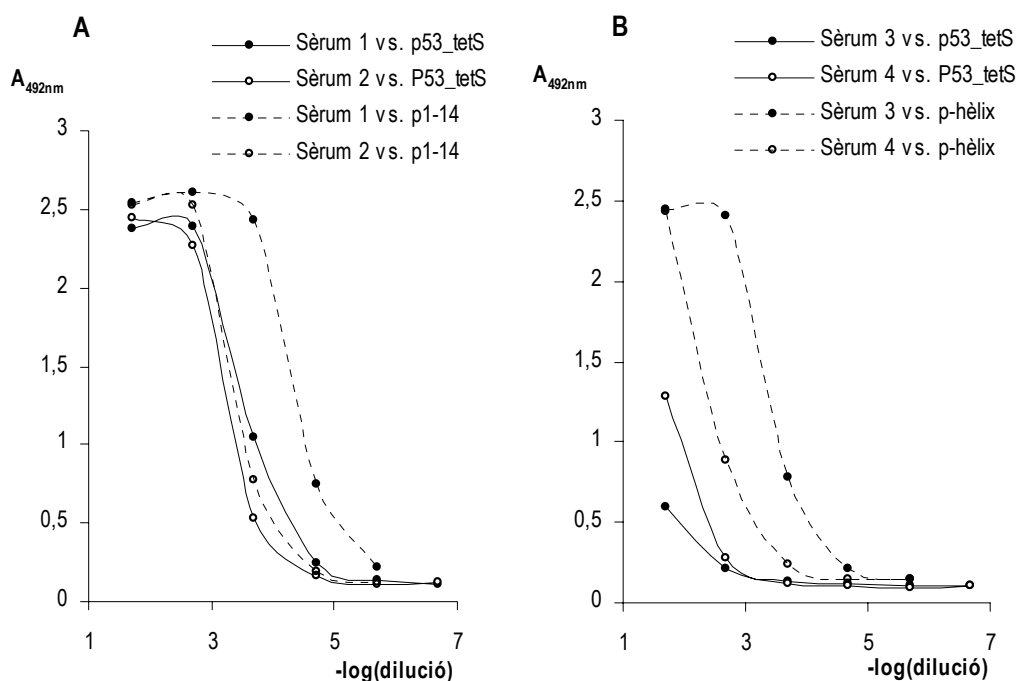


Figura Apèndix.2 Resultat dels ELISA obtinguts immobilitzant en la placa p53_tetS o el pèptid corresponent. **A** – Anàlisi dels sèrums obtinguts a partir dels conills inoculats amb el conjugat p1-14-KLH **B** – Anàlisi dels sèrums obtinguts a partir dels conills inoculats amb el conjugat p-hèlix-KLH.

En el cas dels anticossos dirigits als residus 311-324 de la p53 (Ab1-14), s'ha obtingut, al menys per un dels animals, una resposta similar independentment que en la placa d'ELISA s'hi hagi immobilitzat el pèptid p1-14 o la p53_tetS. Per contra, en el cas dels anticossos dirigits als residus 341-354 (Ab-hèlix), sembla que el reconeixement és pitjor quan s'immobilitza la p53_tetS en lloc del pèptid p-hèlix.

L'explicació més probable d'aquest fet, és que en el cas de la regió de la p53_tetS corresponent als residus 311-324, aquesta està molt poc estructurada i els anticossos dirigits al pèptid p1-14 reconeixen fàcilment aquesta zona. En canvi, la regió corresponent als residus 341-354 en la p53_tetS està molt estructurada, i als anticossos dirigits al pèptid p-hèlix, el qual pràcticament no presenta cap estructura secundària clara, els hi costa molt més reconèixer aquesta zona.

Això però, no és un problema, ja que normalment l'afinitat anticòs-proteïna és tan elevada, que és molt difícil de competir-hi, però el fet de tenir anticossos de baixa afinitat obre les portes a poder-los utilitzar en experiments de competició. D'altra banda, els anticossos Ab-1-14 poden ser molt útils en experiments en els quals es vulgui detectar la presència de p53_tetS.

Purificació dels anticossos

Per tal de poder purificar els anticossos Ab1-14 i Ab-hèlix, s'han preparat dues columnes d'afinitat a partir dels pèptids p1-14 i p-hèlix.

En cada cas, per preparar la columna s'han tractat 2ml de rebliment de EAH Sepharose 4B amb MBS i després s'ha fet reaccionar amb el pèptid amb la cisteïna lliure en tampó fosfat 0,1M pH 7,8. Posteriorment s'ha tractat amb β -mercaptoetanol, s'ha rentat amb tampó fosfat i s'ha empaquetat en una columna de 1cm de diàmetre.

Per dur a terme la purificació s'han utilitzat injeccions de 2ml de mescles de 1ml de mostra + 1ml de Tris-HCl 40mM NaCl 1M pH 7,7. La fracció no retinguda s'ha eluït a un flux baix (0,15ml/min) en tampó Tris-HCl 20mM NaCl 0,5M pH 7,7 fins que s'ha observat una estabilització de la línia de base. A continuació, s'han eluït els anticossos retinguts en la columna mitjançant tampó glicina-HCl 0,1M pH 2,5 a un flux més alt (0,4ml/min) i recollint les fraccions en tubs amb una gota de tampó Tris-HCl 2M pH 8,8. Les fraccions amb els anticossos s'han unit i dialitzat en front de PBS el més ràpid possible.

Així doncs, s'han pogut preparar dos anticossos dirigits a diferents regions de la p53_tetS i se n'ha posat a punt la seva purificació.

