

CAPÍTOL 1

P53_TETS

Un dels principals objectius d'aquest treball, ha estat poder establir una metodologia d'obtenció del domini de tetramerització de la p53 eficaç, de manera que es pugui accedir a l'obtenció de quantitats elevades de proteïna. A més a més, si es considera que sovint les mostres de proteïna són conservades durant llargs períodes de temps, també s'ha plantejat la necessitat d'establir determinats sistemes de control que permetin conèixer l'estat de la proteïna de forma fiable i ràpida. Per últim per poder dur a terme el disseny dels lligands peptídics, s'ha realitzat una anàlisi detallada dels diferents residus que formen l'anomenat motiu hidrofílic en la superfície del domini.

1.1 OBTENCIÓ DEL DOMINI DE TETRAMERITZACIÓ DE LA P53

La metodologia escollida per dur a terme l'obtenció del domini de tetramerització de la p53 ha estat l'expressió en cultius bacterians d'*E.Coli*. D'entrada, es podria plantejar la utilització de síntesi química, la qual té la gran avantatge que permet introduir aminoàcids no naturals així com modificacions en la

seqüència d'una forma relativament senzilla. En comparació amb les tècniques recombinants, però, el cost econòmic de l'obtenció dels mil·ligrams necessaris per dur a terme els estudis d'interacció, podria arribar a ser molt més elevat. A més a més, mitjançant la utilització dels medis de cultiu adequats, les tècniques recombinants obren la porta a l'obtenció del domini amb marcatge isotòpic de ^{15}N i/o ^{13}C necessari per dur a terme els estudis de ressonància magnètica nuclear. El cost econòmic de sintetitzar el domini amb marcatge de ^{15}N i/o ^{13}C seria elevadíssim.

El domini de tetramerització de la p53 (p53_tet), està format pels residus 319-360. L'estructura d'aquest fragment és la utilitzada en tots els càlculs computacionals, així com en les representacions gràfiques del domini. Malgrat això, s'ha expressat i purificat el fragment corresponent als residus 311-367 (p53_tetS) el qual dóna uns rendiments d'expressió força més elevats (figura 1.1)⁷⁶. A més a més, el fet d'introduir aquestes cues en els extrems no varia ni l'estructura ni l'estabilitat global del domini. La part més estructurada correspon al fragment 323-357.

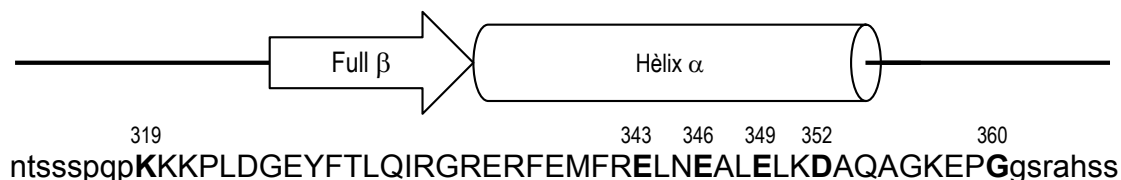


Figura 1.1 Seqüència de la p53_tetS.

Durant el present treball s'han dut a terme diferents preparacions de proteïna utilitzant diferents nivells de marcatge isotòpic. La primera preparació es va realitzar mitjançant una estada al laboratori del Dr. Mauricio G. Mateu al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid, on es va aprendre la metodologia necessària per posar a punt el procés d'expressió i purificació en el nostre laboratori. En tots els casos el procés de purificació ha estat pràcticament el mateix, així com el procés d'expressió, en el qual s'hi introdueixen certes diferències en funció de si s'expressa amb o sense marca isotòpica.

1.1.1 EXPRESSIÓ

El procediment d'expressió, està bàsicament format per quatre etapes les quals es poden resumir breument en:

- a) **Clonació.** Inserció de l'ADN codificant per la regió d'interès a un vector d'expressió, el qual normalment és un plàsmid (fragment d'ADN circular).

⁷⁶ Mateu, M.G. & Fersht, A.R., *EMBO J.*, (1998), **17**, 2748-2758

- b) **Preparació de cèl·lules competents.** Permeabilització parcial de la paret cel·lular dels bacteris, de manera que se'ls hi pugui introduir el vector d'expressió corresponent.
- c) **Transformació.** Introducció del vector d'expressió en les cèl·lules competents.
- d) **Expressió.** Creixement del cultiu cel·lular i inducció de l'expressió de la proteïna corresponent mitjançant l'addició d'un promotor de transcripció.

En el present treball, l'etapa de clonació no ha estat necessària, ja que el vector d'expressió amb el fragment d'ADN corresponent a la p53_tetS ja clonat, ha estat cedit pel Dr. Mauricio G. Mateu. En aquest cas, s'ha utilitzat un plàsmid tipus pET-23b el qual confereix resistència a ampicilina, fet que permet seleccionar els bacteris que mantinguin el vector en el interior de la cèl·lula mitjançant la utilització de medis de cultiu amb ampicilina.

Pel que fa a l'obtenció de competents i a la transformació, el procediment és el mateix independentment que es vulgui expressar amb o sense marca isotòpica. Les diferències, en funció de si es vol obtenir proteïna sense marca isotòpica o amb marca de ^{15}N i/o ^{13}C , venen determinades en l'etapa d'expressió.

1.1.1.1 Expressió sense marca isotòpica

En aquest cas el creixement del cultiu es realitza en un medi ric amb tota mena de nutrients (medi LB). En aquestes condicions el desenvolupament de les bactèries és molt favorable, i es poden arribar a obtenir nivells d'expressió molt elevats.

La inducció de l'expressió, es realitza quan els bacteris han assolit una absorbància de 1,0-1,2 a 600nm ⁷⁷. A diferència de l'expressió amb marca isotòpica, s'ha de procurar que els bacteris no superin una $A_{600\text{nm}}$ de 1,2 abans de la inducció. Això, és degut que en medi LB els bacteris tenen un desenvolupament molt ràpid, i si es permet que creixin massa arriba un moment que el medi en queda saturat i l'eficiència de l'expressió d'aquests bacteris cau en picat degut a la falta de nutrients. Per induir l'expressió, s'addiciona IPTG fins a una concentració final de 0,4mM. En aquestes condicions de treball, així com en les descrites en l'expressió amb marca isotòpica, hi ha un cert nivell d'expressió basal de la p53_tetS, és a dir, fins i tot abans d'afegir l'IPTG hi ha una mica d'expressió de p53_tetS.

La soca d'*E.Coli* utilitzada en aquest cas és la BL21(DE3).

⁷⁷ La $A_{600\text{nm}}$, altrament anomenada densitat òptica a 600nm ($DO_{600\text{nm}}$), dóna una idea de la quantitat de bacteris que hi ha en el medi.

1.1.1.2 Expressió amb marca isotòpica

A diferència de l'expressió en un medi ric, en aquest cas, el creixement del cultiu es realitza en un medi en el qual la composició dels diferents nutrients està totalment controlada. Aquesta composició està constituïda de manera que s'assegura que l'única font de nitrogen que reben els bacteris en el seu desenvolupament, és la que prové del NH_4Cl que s'hi ha addicionat. De la mateixa manera, s'assegura que l'única font de carboni és la que prové de la glucosa addicionada. Així, per tal d'obtenir proteïnes amb marcatge isotòpic de ^{15}N , s'utilitza $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, i per obtenir proteïnes amb marcatge isotòpic de ^{13}C s'utilitza glucosa- ^{13}C .

En la literatura s'hi poden trobar diverses variants d'aquesta mateixa idea. En aquest treball s'ha utilitzat el medi mínim M9, el qual bàsicament es caracteritza per l'utilització d'un medi amb una combinació de diferents sals i vitamines, i amb una concentració final de 1g de NH_4Cl i 4g de glucosa per litre de medi de cultiu.

Respecte l'expressió en medi ric, s'observen certes diferències degut al menor contingut en nutrients del medi. D'una banda, el creixement dels bacteris es dona molt més lentament, i de l'altra els rendiments d'expressió disminueixen notablement. Per tal de compensar al màxim la disminució en l'eficiència del creixement i de l'expressió, sempre s'utilitzen bacteris recentment transformats ja que aquests sovint es desenvolupen millor que els que se'ls hi ha interromput el creixement normal, per exemple, mitjançant emmagatzematge en fred. A més a més, com que el desenvolupament és més lent, no s'indueix l'expressió de la proteïna, fins que no s'ha assolit una $A_{600\text{nm}}$ d'entre 1,2 i 1,3. En aquest cas, a més, s'addiciona IPTG fins a una concentració final de 1mM.

En l'expressió en medi mínim, la soca utilitzada és la BL21(DE3)pLysS, la qual, per l'experiència del Dr. Mauricio G. Mateu, se sap que en el medi mínim dona uns rendiments d'expressió més alts que la BL21(DE3). D'altra banda, aquesta soca incorpora resistència al cloroamfenicol, de manera que en els medis de cultiu s'hi pot tenir un doble sistema de selecció mitjançant la utilització d'ampicilina i cloroamfenicol. També incorpora lisozima, la qual facilita el trencament de la paret bacteriana en l'etapa prèvia a la purificació.

En ambdós tipus d'expressió es realitza tot el procés a 37°C. El temps d'inducció és de 3h, i posteriorment se separen les cèl·lules del medi de cultiu mitjançant centrifugació.

1.1.2 PURIFICACIÓ

Per tal d'alliberar les proteïnes solubilitzades en el citoplasma, es trenca la paret cel·lular mitjançant sonicació. Afortunadament la proteïna no s'expressa en cossos d'inclusió, de manera que després de sonicar les cèl·lules, es duu a terme la purificació amb el sobrenadant resultant. D'altra banda, en el

citoplasma la p53_tetS ja està estructurada i en forma tetramèrica, de manera que en el procés de purificació no és necessari dur a terme cap procés de plegament.

La purificació del domini de tetramerització de la p53, consta de tres etapes, les quals van disminuint en especificitat. Les fraccions recollides en les diferents etapes de purificació, s'analitzen mitjançant electroforesi SDS-PAGE. En ser una anàlisi en condicions desnaturalitzants, i degut al baix pes molecular del monòmer de p53_tetS (6400Da aprox.), s'utilitzen gels de 15% acrilamida-glicerol. Respecte als gels d'acrilamida normalment utilitzats en l'anàlisi de proteïnes, els gels d'acrilamida-glicerol tenen una major densitat, fet que evita la difusió de les bandes de baix pes molecular. Aquesta difusió, en dificulta la detecció clara.

1.1.2.1 Bescanvi iònic

El punt isoelectric calculat de la p53_tetS és d'aproximadament de 9,4⁷⁸. Així, si es té la proteïna dissolta en un tampó a pH 6, aquesta globalment té una càrrega positiva. Aprofitant aquest fet, en la primera etapa de purificació, s'utilitza una columna de bescanvi catiònic treballant en tampó MES a pH6. L'elució de la proteïna, es realitza amb un gradient de força iònica, mitjançant concentracions creixents de NaCl.

Aquesta purificació presenta varies avantatges. Primerament, el punt isoelectric és una propietat força particular de cadascuna de les proteïnes, de manera que aquest procés de purificació és força selectiu, i permet eliminar una gran quantitat d'altres proteïnes que també s'han expressat (figura 1.2A). A més a més, en aquestes condicions, la major part de les altres proteïnes, fragments d'ADN, etc. no queden retinguts en la columna i només en aquesta etapa, ja es pot obtenir proteïna força pura (figura 1.2B). Finalment, s'ha de tenir en compte que després d'una etapa com la sonicació, en la qual es té un volum força gran (uns 40ml per cada litre de cultiu), amb aquest tipus de tècnica s'obté una concentració de la mostra considerable. Això és així, perquè mitjançant aquest tipus de columna la quantitat de mostra no ve limitada pel volum en el que està dissolta, sinó pels mil·ligrams totals de proteïna, ja que aquesta hi queda retinguda fins que s'arriba a la saturació de la columna.

⁷⁸ <http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>

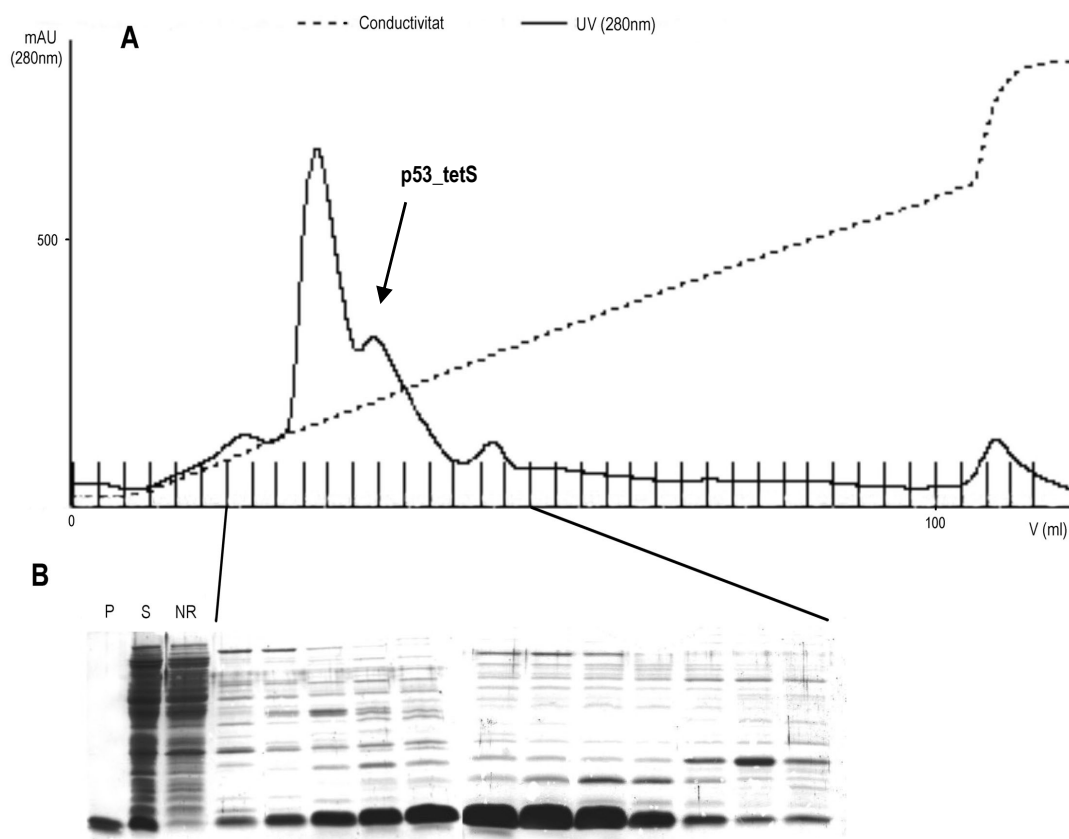


Figura 1.2 A- Cromatograma de la purificació mitjançant bescanvi catiònic.

B- Electroforesi SDS-PAGE de les diferents fraccions. On: **P** - Patró p53_tetS, **S** – Sobrenadant i **NR** – Fracció no retinguda

1.1.2.2 Exclusió molecular

Les fraccions que contenen p53_tetS amb una proporció majoritària respecte altres proteïnes s'uneixen i es purifiquen mitjançant exclusió molecular. En aquest cas, s'utilitza una columna amb rebliment Superdex75 (format per esferes d'agarosa i dextrà entrecreuat) el qual permet separar proteïnes d'un tamany d'entre 3 i 70KDa (figura 1.3A).

Malgrat que la separació per tamany no és molt selectiva, gràcies a la puresa de les fraccions que s'obtenen mitjançant l'etapa de bescanvi iònic, després d'aquesta etapa d'exclusió, ja es poden obtenir fraccions amb p53_tetS d'elevada puresa (figura 1.3B). En aquest punt es col·lecten les diferents fraccions en funció de si s'hi observen altres bandes en el gel d'electroforesi. Així, es poden obtenir dues fraccions de diferent grau de puresa les quals a partir d'aquest punt es tracten per separat.

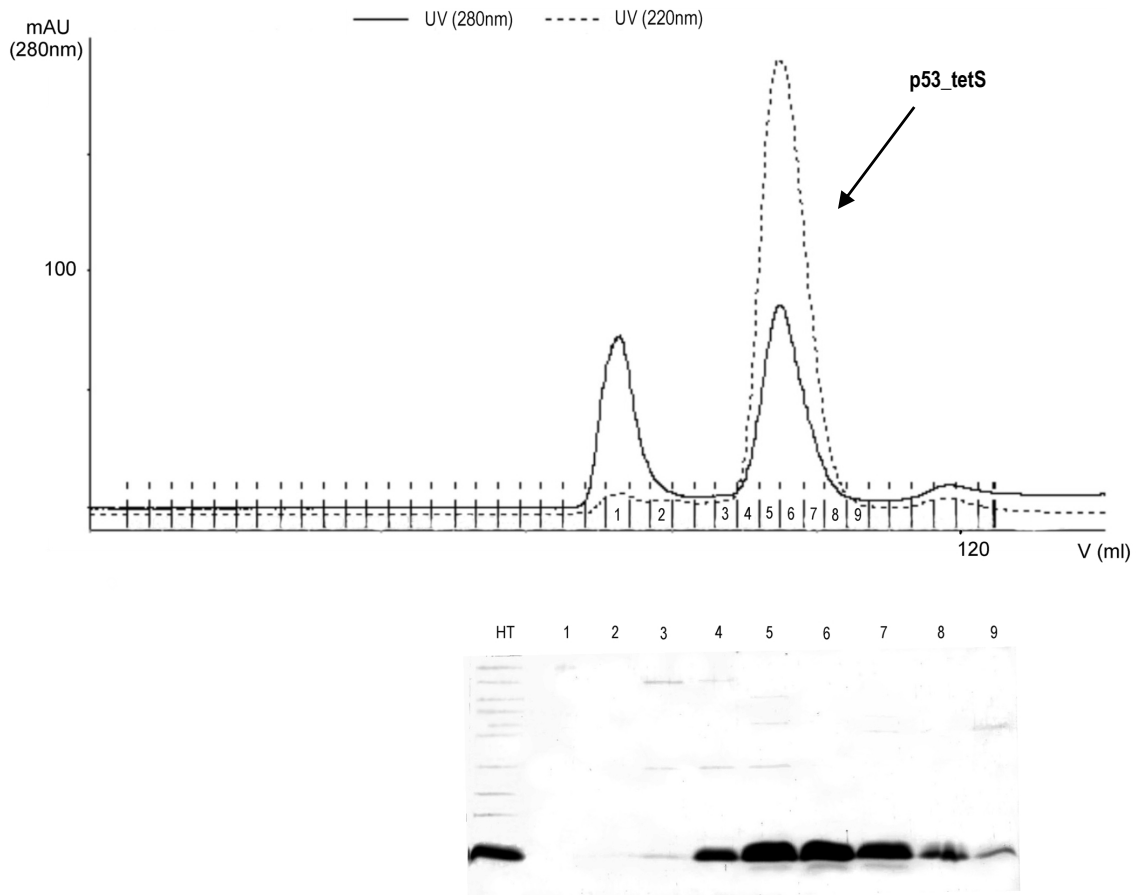


Figura 1.3 A- Cromatograma de la purificació mitjançant exclusió molecular.

B- Electroforesi SDS-PAGE de les diferents fraccions. On: HT – Conjunt de les fraccions provinents de la purificació per bescanvi iònic.

1.1.2.3 Dessalat

Per tal d'eliminar l'elevat contingut en sal i canviar el tampó de les fraccions provinents de l'etapa d'exclusió molecular, s'utilitza una columna de dessalat. Aquesta columna conté un rebliment de Sephadex G-25 (format per dextrà entrecreuat), el qual té un límit d'exclusió de 5KDa. Així, les molècules d'elevat pes molecular surten amb volum buit (V_0), i les sals i el tampó en el qual estan dissoltes surten amb el volum del llit cromatogràfic. Aquest fet, permet obtenir la proteïna dissolta en el tampó amb el que s'ha realitzat la elució.

Durant el present treball, s'han utilitzat dos dessalats diferents en funció de com es desitja emmagatzemar la proteïna. Es pot utilitzar tampó fosfat 25mM pH 7, però també es pot dur a terme aquesta elució utilitzant aigua.

Alternativament el dessalat de la mostra es pot dur terme mitjançant diàlisi, tot i ser més recomanable la utilització d'una columna, ja que permet emmagatzemar la proteïna molt més ràpidament (1 hora en front 1 dia aproximadament).

1.1.2.4 Emmagatzematge

S'ha emmagatzemat la proteïna de dues maneres diferents, observant-se en ambdós casos una bona estabilitat tant química com estructural durant llargs períodes de temps. Les dues alternatives són:

- a) En tampó fosfat 25mM a pH7 i a -80°C. Entre 0 i -20°C es pot produir el fenomen de desnaturalització en fred⁷⁹, de manera que per evitar aquesta possibilitat, és convenient congelar la mostra amb nitrogen líquid abans de guardar-la al congelador.
- b) Liofilitzada i a -20°C. En aquest cas, el dessalat es realitza fent l'elució en aigua.

Per a períodes curts de temps, el més recomanable és mantenir la proteïna a la nevera. En cas que es vulgui mantenir la proteïna a temperatura ambient o a la nevera per un llarg període de temps, és convenient addicionar un 0,02% d'azida sòdica (sempre i quan no interfereixi amb l'experiment que es vulgui realitzar).

1.1.3 CARACTERITZACIÓ I QUANTIFICACIÓ

1.1.3.1 Rendiment

Per determinar la quantitat de p53_tetS que s'ha obtingut en cada una de les preparacions, s'ha utilitzat espectroscòpia UV-Vis, ja que pel monòmer, es coneix el coeficient d'extinció molar a 280nm en tampó fosfat 25mM pH7 ($\epsilon_{280nm} = 1280M^{-1}cm^{-1}$)⁸⁰.

⁷⁹ Privalov, P.L., *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, (1990), **25**, 281-305

⁸⁰ Jonson, C.M., Morin, P.E., Arrowsmith, C.H. & Freire, E., *Biochemistry*, (1995), **34**, 5309-5316

1.1.3.2 Puresa

Per determinar la puresa de cadascuna de les preparacions s'han utilitzat tres criteris:

- La relació d'absorbàncies $A_{280\text{nm}} / A_{260\text{nm}}$ ha de ser $> 1,25$. En cas contrari és indicatiu de la presència de restes d'àcids nucleïcs⁸¹.
- En l'electroforesi SDS-PAGE, no s'han d'observar bandes corresponents a altres proteïnes.
- Mitjançant HPLC s'ha determinat el tant per cent de puresa (figura 1.4). En general, per proteïnes s'obté una millor definició dels pics amb una columna C₄, ja que en una columna C₁₈, en ser una anàlisi en condicions desnaturalitzants (aigua, ACN i TFA o fòrmic), les proteïnes hi queden massa retingudes. Pel cas concret de la p53_tetS, aquesta anàlisi també es pot realitzar mitjançant una columna C₁₈ amb un tamany de porus de 300Å (per exemple, una Symmetry300™ C₁₈). En una columna C₁₈ amb el tamany de porus "normal" (és a dir, 100Å), la p53_tetS hi queda massa retinguda i els pics surten molt amples.

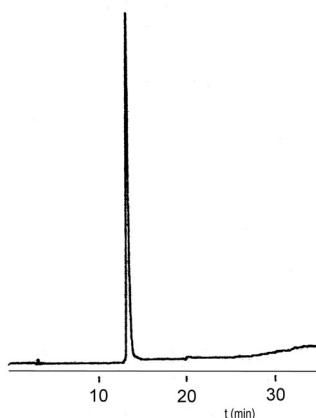


Figura 1.4 HPLC d'una de les mostres de proteïna.

Columna: C₄

Gradient 10-100%B en 30min

Temps de retenció: 13,4min.

1.1.3.3 Caracterització

En aquest cas s'han utilitzat dos criteris diferents.

Espectrometria de masses MALDI-TOF

En l'anàlisi per MALDI-TOF, degut al tractament al qual se sotmet la mostra, majoritàriament es detecten el pic corresponents al monòmer (M^+ , M^{2+} i M^{3+}). A més a més, s'observa que

⁸¹ Layne, E., *Method Enzymol.*, (1957), **3**, 447-454

aproximadament el 80% de les molècules tenen una massa de 131 unitats superior a la massa teòrica del monòmer (figura 1.5). Aquest increment de massa correspon a l'addició d'una metionina en l'extrem N-terminal.

En la biosíntesi de proteïnes, es fa necessari un codó d'iniciació (ATG) el qual codifica per metionina. Com que la p53_tetS és una part d'una proteïna més gran, per dur-ne a terme l'expressió s'ha d'afegir el codó d'iniciació en l'ADN corresponent. Durant l'expressió, en alguns casos la pròpia cèl·lula elimina aquesta metionina "extra" després de la traducció, però en d'altres casos aquesta eliminació no es dona o es dona només parcialment⁸². Aquest últim cas, és el de la p53_tetS. De tota manera, aquesta metionina, com que està en un dels extrems de la proteïna, no n'afecta ni l'estructura ni l'estabilitat.

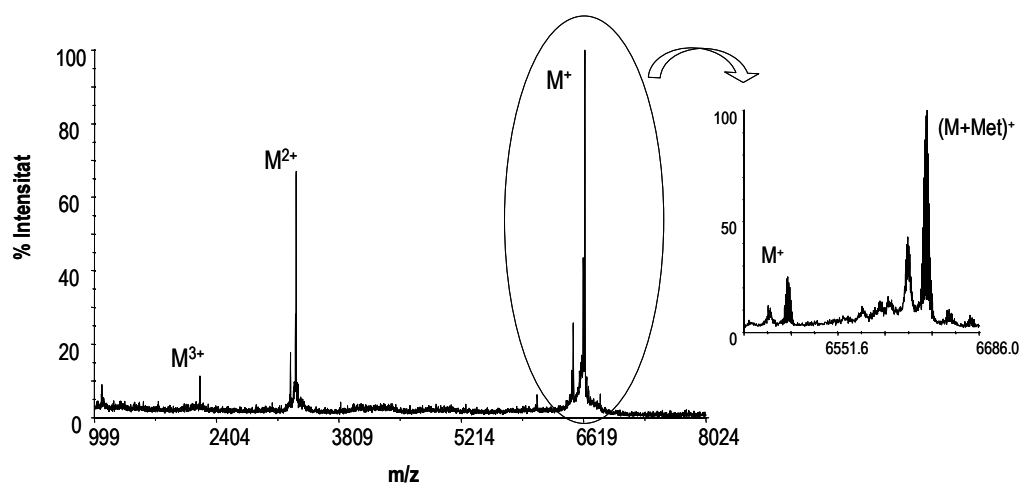


Figura 1.5 MALDI-TOF de p53_tetS-¹⁵N.

La massa promig del monòmer amb metionina que s'ha trobat per a cadascuna de les preparacions ha estat coincident amb la massa teòrica. Així, en funció del marcatge isotòpic s'han trobat les següents masses:

- a) p53_tetS sense marca: 6552Da
- b) p53_tetS-¹⁵N: 6638Da
- c) p53_tetS-¹⁵N,¹³C: 6920Da aprox.

⁸² Voet, D & Voet, J., "Bioquímica", Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1992, p. 987

Espectroscòpia UV-Vis

L'espectre d'absorció de la p53_tetS en tampó fosfat 25mM pH7 té un perfil característic entre 240nm i 320nm (figura 1.6).

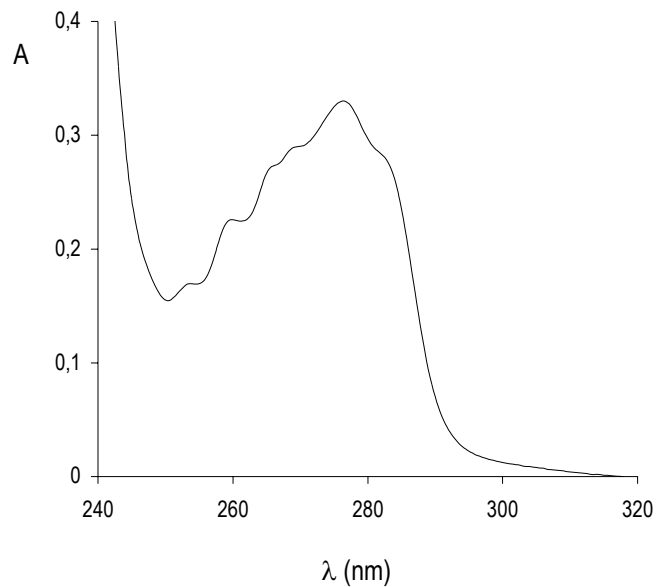


Figura 1.6 Espectre UV d'una mostra de p53_tetS en tampó fosfat 25mM pH 7.

Dicroïsm circular

L'espectre de dicroïsm de la p53_tetS mostra clarament l'elevat percentatge d'hèlix- α , així com la presència de full- β (figura 1.7).

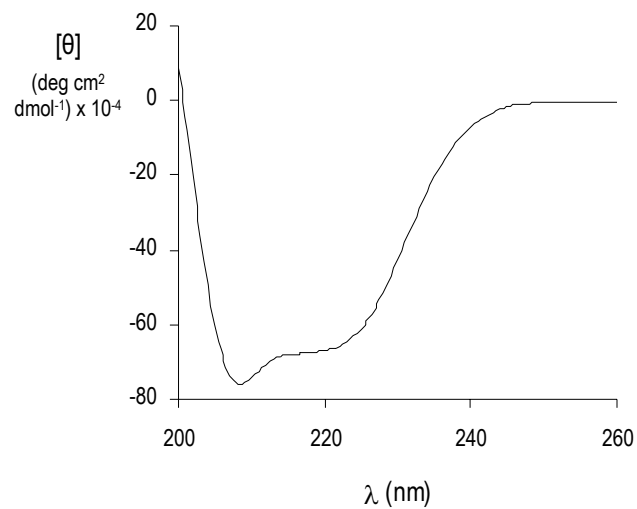


Figura 1.7 Espectre de dicroïsm circular d'una mostra de p53_tetS-¹⁵N 25μM en H₂O pH7 i 25°C.

1.1.4 PREPARACIONS REALITZADES

Els diferents laboratoris on s'han dut a terme les preparacions són:

- 1- **CBM** – Tant l'expressió com la purificació s'han realitzat al laboratori del Dr. Mauricio G. Mateu al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.
- 2- **CID-QO** – L'expressió s'ha realitzat al laboratori de la Dra. Dolors Ludevid al Centre d'Investigació i Desenvolupament, però la purificació s'ha realitzat al Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona.
- 3- **PCB** – En aquest cas tant l'expressió com la purificació s'han dut a terme al les instal·lacions del grup al Parc Científic de Barcelona.

En la taula 1.1 hi ha un recull de les diferents preparacions realitzades durant aquest treball. En aquest recull hi ha només les fraccions considerades suficientment pures per dur a terme els estudis d'interacció. En quasi totes les preparacions també s'han obtingut fraccions d'un grau de puresa més baix (sobretot degut a la presència de restes d'àcids nucleïcs), les quals es podrien purificar mitjançant una columna d'afinitat d'heparina-sepharosa.

Centre	Medi	Marca isotòpica	Rendiment	A_{280nm}/A_{260nm}	Puresa (segons HPLC)
CBM	2,5L. LB	Sense marca	2,8mg ^a	1,37	99%
	0,5L. M9	¹⁵ N, ¹³ C	6,7mg	1,31	99%
CID-QO	2L. M9	¹⁵ N	33mg	1,31	99%
	2L. M9	¹⁵ N, ¹³ C	43mg	1,23 ^b	99%
PCB	2L. M9	¹⁵ N	22mg /21mg ^c	1,28 / 1,27	99% / 95%

Taula 1.1 Resum de les preparacions de p53_tetS realitzades.

a- El baix rendiment és degut a la pèrdua de gran part de la mostra durant el procés de purificació.

b- Tot i que el valor està lleugerament per sota de 1,25 les anàlisis per electroforesi i per HPLC denoten que la puresa de la mostra és suficient.

c- En aquesta preparació s'han obtingut dues fraccions de diferent puresa, separades en la taula mitjançant un /.

Donats aquests resultats, es pot concloure que s'ha posat a punt la metodologia per obtenir en el nostre laboratori entre 15 i 20mg de p53_tetS per litre de medi mínim M9. Aquest és un rendiment que

es pot considerar força alt en comparació amb els rendiments obtinguts més habitualment en l'expressió de proteïnes en aquestes condicions.

1.2 ESTABILITAT

La p53_tetS és, a priori, una proteïna molt estable la qual en les condicions d'emmagatzematge descrites no hauria de presentar cap problema d'estabilitat. Tot i això, s'ha cregut necessari posar a punt alguns mètodes de "control de qualitat" que permetin en qualsevol moment tenir una certesa absoluta que la proteïna ha mantingut una estabilitat tant química com estructural.

1.2.1 Control estabilitat química

En la seqüència de la p53_tetS només hi ha dos residus que puguin ser propensos a modificacions químiques, la metionina de l'extrem N-terminal i la 340, les quals tenen el perill potencial d'oxidar-se.

La manera més directe de detectar aquesta oxidació, és mitjançant espectrometria de masses, ja que s'hauria d'observar un increment de 16 ó 32 unitats degut a l'oxidació d'alguna de les metionines a metionina sulfòxid. Mitjançant HPLC-MS, es pot comprovar si s'ha produït o no aquesta oxidació, al mateix temps que es comprova si s'hi ha produït alguna mena de degradació deguda a la presència de proteases (figura 1.8)

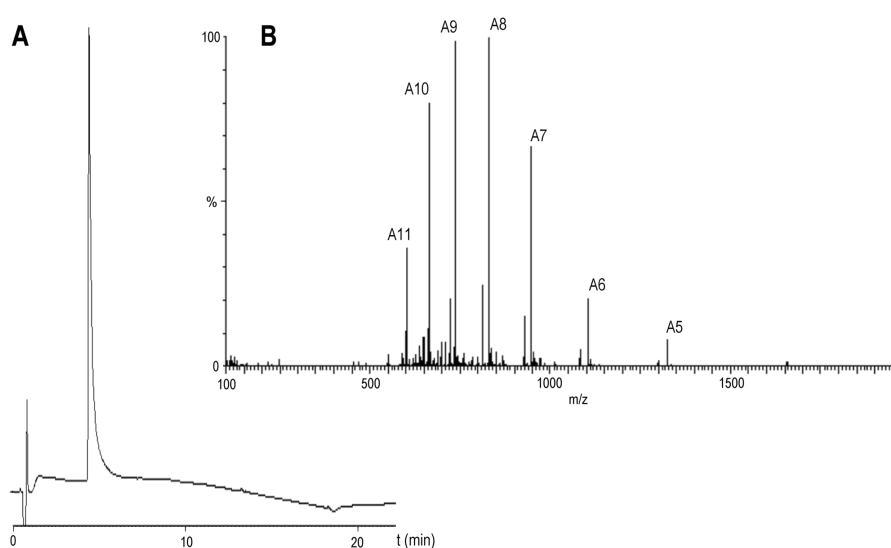


Figura 1.8 HPLC-MS d'una mostra de p53_tetS-¹⁵N emmagatzemada durant 2 anys.

A- HPLC (Columna: Symmetry300™ C₁₈; gradient: 5-95%B en 15min; temps de retenció: 5,0 min).

B- Electrospai corresponent a la regió del pic. On AX correspon a (M+X)/X (M=6638Da).

1.2.2 Control estabilitat estructural

En condicions lleugerament extremes de pH i temperatura, s'ha trobat que el domini de tetramerització de la p53 pot arribar a formar fibrilles amiloides en el període d'un mes i de forma totalment reversible⁸³. D'altra banda, a -20°C es pot produir el fenomen de desnaturalització en fred.

Per comprovar que tota la proteïna es manté en forma tetramèrica i que no hi ha ni monòmer ni espècies oligomèriques de tamany superior al del tetràmer, s'ha utilitzat l'exclusió molecular. Mitjançant una columna analítica (Superdex75 HR 10/30), es pot comprovar que les mostres conservades a -80°C presenten una perfecte estabilitat en aquest sentit (figura 1.9)

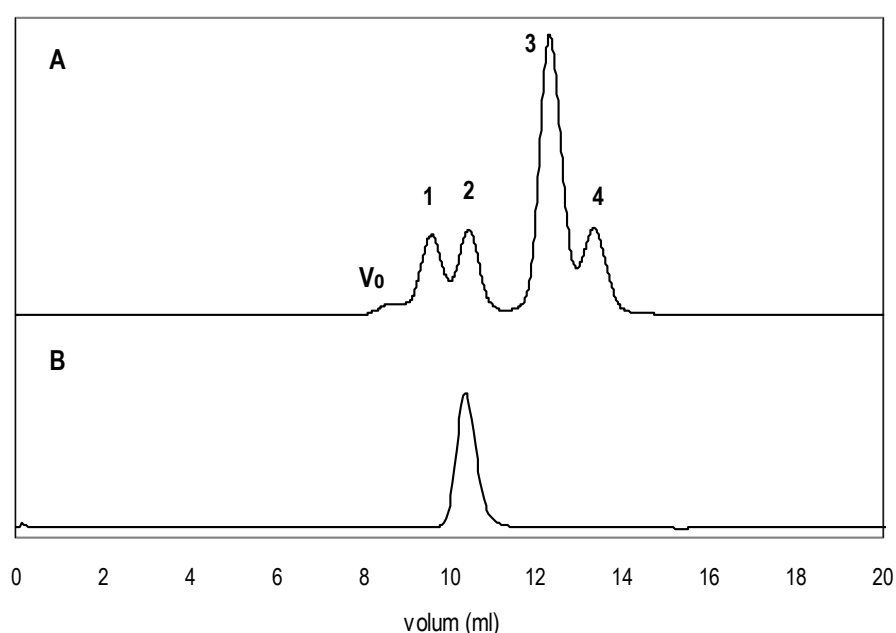


Figura 1.9 Perfil d'elució obtingut mitjançant una columna Superdex 75HR 10/30 (flux: 0,5ml/min).

A – Calibració on: 1- Albúmina (67KDa), 2 - Ovalbúmina (43KDa), 3 - Quimotripsingen (25KDa) i 4 - Ribonuclasa (13,7KDa).

B- Mostra p53_tetS-¹⁵N emmagatzemada durant 2 anys.

S'ha de destacar que el volum d'elució del tetràmer, segons la calibració de la columna, no es correspon al volum d'elució d'una espècie d'uns 25KDa, sinó al d'una espècie d'uns 40KDa. Aquest fet, però, està en perfecte consonància amb els descrits en la literatura⁸⁴ i probablement és degut que la p53_tetS no té una forma esfèrica.

⁸³ Lee, A.S., Galea, C., DiGiammarino, E.L., Jun, B., Murti, G., Ribeiro, R.C., Zambetti, G., Schultz, C.P. & Kriwacki, W., *J. Mol. Biol.*, (2003), **327**, 699-709

⁸⁴ McCoy, M, Stavridi, E.S., Waterman, J.L.F., Wieczorek, A.M., Opella, S.J. & Halazonetis, T.D., *EMBO J.*, (1997), **16**, 6230-6236

En el cas d'haver-hi monòmer o dímer s'haurien d'observar un pic a volums d'elució superiors, i en el cas d'haver-hi alguns agregats aquests haurien d'eluir amb el volum buit de la columna. Mitjançant aquesta tècnica, però, no es poden detectar petits canvis locals en l'estructura que no afectin significativament a l'estabilitat global del domini. Per comprovar aquest fet, es pot utilitzar la ressonància magnètica nuclear ja que en el cas que hi hagués alguna distorsió de l'estructura, s'haurien d'observar, per exemple, canvis en el desplaçament d'algun dels senyals en l'espectre de $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC. S'ha pogut comprovar que no hi ha diferències entre una mostra de p53_tetS "nova" i una d'uns dos anys d'antiguitat.

Així doncs, s'ha comprovat que mostres emmagatzemades durant uns dos anys tenen una bona estabilitat tant química com estructural. En el present treball no s'han utilitzat mostres amb una antiguitat superior a aquesta.

1.3 EL MOTIU HIDROFÍLIC

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la p53 presenta en el seu domini de tetramerització una hèlix α amb quatre residus àcids (E343, E346, E349 i D352). Aquests residus estan en una distribució $i / i+3 / i+6 / i+9$, i els seus grups carboxilat queden exposats al solvent. El domini de tetramerització de la p53 és un homotetràmer, en el qual els diferents monòmers s'associen no covalentment formant una estructura que es pot descriure com a dímer de dímers. Així doncs, en cada domini hi ha quatre motius tetraaniònics equivalents.

Una anàlisi més detallada, però, permet observar que l'accessibilitat de cadascun d'aquests residus és diferent⁸⁵. D'altra banda, en alguns casos aquests residus interaccionen amb d'altres residus del tetràmer a través de contactes intermonomèrics (dintre del dímer primari) o contactes interdimèrics (entre dímers primaris).

El residu E343, està clarament exposat al solvent i a més pràcticament no contribueix de cap manera a l'estabilitat global de la proteïna. Tot i això, a través de l'esquelet, forma un enllaç d'hidrogen interdimèric amb la cadena lateral del residu K351.

Els residus E346 i D352, queden força exposats però contribueixen lleument a l'estabilitat global del domini, fet que denota que estan interaccionant amb altres residus del domini. El residu D352, de fet, es troba que està formant un pont salí intermonomèric amb el residu R337. Aquest residu d'arginina

⁸⁵ Mateu, M.G., Sánchez del Pino, M.M. & Fersht, A.R., *Nat. Struct. Biol.*, (1999), **6**, 191-198

Salvatella, X., Haack, T., Gairi, M., de Mendoza, J., Pecuh, M.W., Hamilton, A.D. & Giralt, E., in Pons, M. (Ed), *NMR in Supramolecular Chemistry*, Kluwer Academia Publishers, Dordrecht, The Netherlands, (1999), pp 267-280

contribueix de forma essencial a l'estabilitat global del domini, bàsicament a través de la part alifàtica de la cadena lateral la qual forma part del nucli hidrofòbic del domini. Hi ha, però, una part de l'estabilització la qual prové de la formació del pont salí amb el D352, fet que es pot comprovar en el mutant R337H, el qual provoca una desestabilització del domini depenent del pH⁸⁵. Aquesta mutació està associada al carcinoma adrenocortical (ACC) en nens⁸⁶.

Pel residu E349, es troba que queda lleugerament menys accessible que els altres tres. A més a més, es troba que està formant un clúster d'enllaços d'hidrogen intermonomèrics amb els residus R333 i N345. Aquesta interacció es dona a través les cadenes laterals dels residus E349 i N345, el grup amida de l'esquelet del residu R333 i molècules d'aigua. Aquesta interacció contribueix moderadament a l'estabilitat global de la proteïna.

D'altra banda, en l'hèlix α del domini de tetramerització de la p53, hi ha dos residus àcids més (E336, E339) els quals queden exposats al solvent. Tot i no estar en una distribució de $i / i+3 / i+6 / i+9$, respecte els altres quatre residus àcids, en una visió tridimensional del domini es pot veure clarament que queden molt propers del motiu tetraaniònic plantejat inicialment (figura 1.10). Tots dos residus estan molt exposats al solvent, i només el residu E339 sembla que té un efecte moderat en l'estabilitat global del domini. Així aquests dos residus, juntament amb els residus E343 i E346 defineixen un altre motiu tetraaniònic del tipus $i / i+3 / i+7 / i+10$.

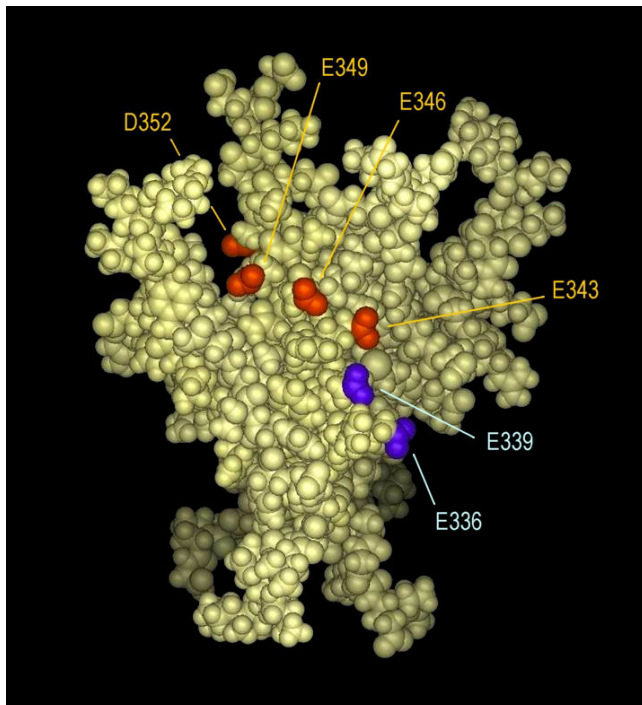


Figura 1.10 Representació del motiu hidrofílic d'un dels monòmers del domini de tetramerització de la p53. En taronja, es poden veure els carboxilats del motiu tetraaniònic inicialment plantejat i en lila els carboxilats dels "nous" residus àcids.

⁸⁵ DiGiammarino, E.L., Lee, A.S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R.C., Zambetti, G. & Kriwacki, R.W., *Nat. Struct. Biol.*, (2002), **9**, 12-16

⁸⁶ Ribeiro, R.C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G.P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A.R., DeLacerda, L., Rabin, M., Cadwell, C., Sampaio, G., Cat, I., Stratakis, C.A. & Sandrini, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2001), **98**, 9330-9335

La superfície del domini de tetramerització de la p53, té un caràcter polar molt elevat, i a part d'aquests sis residus àcids també s'hi poden trobar els residus E326, R333, R335, R337 i R342 (figura 1.11). En general, aquests residus no contribueixen de forma essencial a l'estabilitat del domini. El fet sorprenent, però, és que si es compara la seqüència primària de la p53 de diferents espècies, es pot veure que tots aquests residus han estat altament conservats durant l'evolució⁸⁷. Pels residus R337, E349 i D352, l'explicació d'aquesta conservació es troba en la seva lleu contribució a l'estabilitat global del domini. Per a la resta de residus, però, l'explicació no és tan clara i de fet es poden plantejar dues alternatives. D'una banda, és possible que tots ells contribueixin de forma cooperativa en la formació del tetràmer. De fet es pot veure que les cadenes laterals dels residus E326, R335, E339, R342 i E346 estan força properes i s'alternen en la superfície del domini amb una separació entre carboxilats i guanidinis d'entre 4 i 6 Å. Alternativament, però, es pot pensar que aquests residus interaccionen amb altres parts de la proteïna i/o amb altres proteïnes. Si aquestes interaccions fossin importants per la funció de la proteïna, això explicaria aquesta elevada conservació.

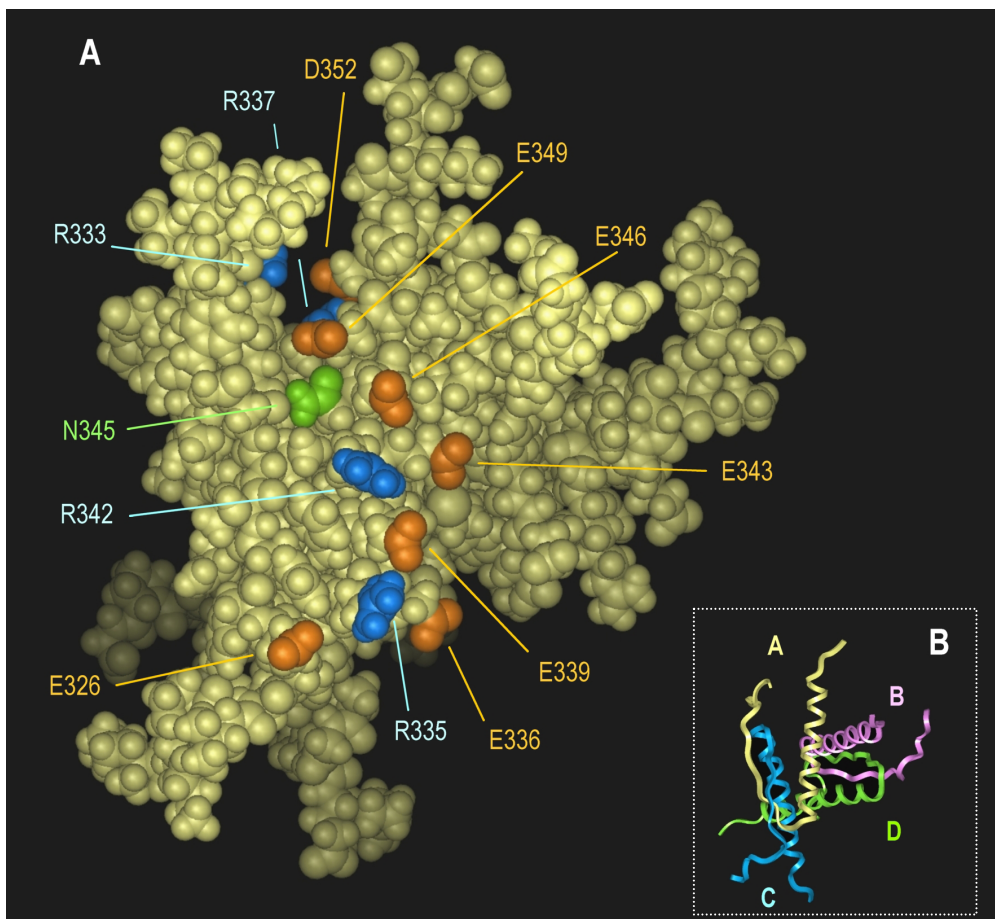


Figura 1.11 A – Representació dels residus polars situats al voltant del motiu hidrofílic d'un dels monòmers (en aquest cas, del monòmer A). En taronja es poden veure els carboxilats, en blau els grups guanidini i en verd el grup amida. **B** – Orientació relativa del tetràmer en aquesta representació.

⁸⁷ Chène, P., *Oncogene*, (2001), **20**, 2611-2617

Finalment, es pot veure que respecte una hèlix α canònica, el motiu tetraaniònic presenta una major compactació. Això es pot observar en la distància que separa les cadenes laterals dels residus àcids, la qual és més curta del que es podria esperar per una hèlix α canònica. Aquesta desviació, però, també es deu que l'orientació de les cadenes laterals en una proteïna plegada no és la mateixa que la d'una estructura canònica.

La resta de residus que formen part de l'hèlix, són de caràcter bàsicament hidrofòbic (figura 1.12).

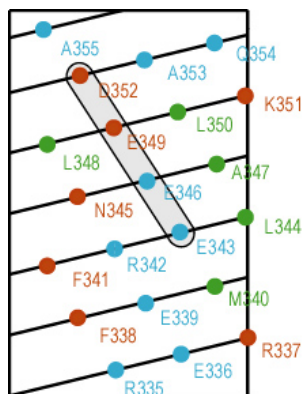


Figura 1.12 Representació esquemàtica dels diferents residus que formen part de l'hèlix. En blau estan representats els residus amb les cadenes laterals exposades al solvent, en vermell els residus amb les cadenes laterals involucrades en contactes intermonomèrics i en verd els residus amb les cadenes laterals involucrades en contactes interdimèrics.

Així doncs, es pot concloure que en la superfície del domini de tetramerització de la p53 hi ha 2 motius tetraaniònics solapats formats pels residus E336, E339, E343, E346, E349 i D352. Tot i que avui en dia no està clar quina és la funció exacta de cada un d'aquests residus, és raonable pensar que la possibilitat de trobar lligands capaços de reconèixer un d'aquests dos motius, pot obrir la porta a poder modular en un futur l'estabilitat i/o la funció de la proteïna supressora de tumors p53. De fet, excepte pel residu E346, s'han trobat casos de càncer en el qual hi ha una mutació d'algun d'ells.

