

CAPÍTOL 2

CAP DE SÈRIE

El segon gran objectiu d'aquest treball, ha estat trobar un pèptid amb quatre arginines capaç de reconèixer el motiu tetraaniònic format pels residus E343, E346, E349 i D352, que hi ha en la superfície del domini de tetramerització de la p53. Per a realitzar aquest objectiu, ha estat necessari establir una estratègia de disseny-síntesi-avaluació que permeti obtenir un cap de sèrie, és a dir, un pèptid capaç d'interaccionar amb la p53_tetS tot i que sigui amb afinitat baixa o moderada.

2.1 ESTRATÈGIA

L'estratègia que s'ha plantejat per tal de trobar el cap de sèrie està basada en un cicle de disseny, síntesi i avaluació esquematitzat en la figura 2.1. Per dur a terme el disseny del lligand s'utilitzen eines de modelat molecular amb les quals també es fa una avaluació *in silico* de la possible interacció entre els pèptids i la p53_tet. Segons el resultat d'aquesta avaluació, es decideix quin és el pèptid que es sintetitza i posteriorment s'avalua experimentalment mitjançant espectroscòpia de fluorescència. En el

cas que no hi hagi interacció, es torna a començar aquest cicle de disseny-síntesi-avaluació. En l'estratègia plantejada, es va seguint aquest cicle fins a trobar un cap de sèrie, és a dir, un pèptid que tingui un afinitat per la p53_tetS detectable per espectroscòpia de fluorescència en les condicions experimentals utilitzades.

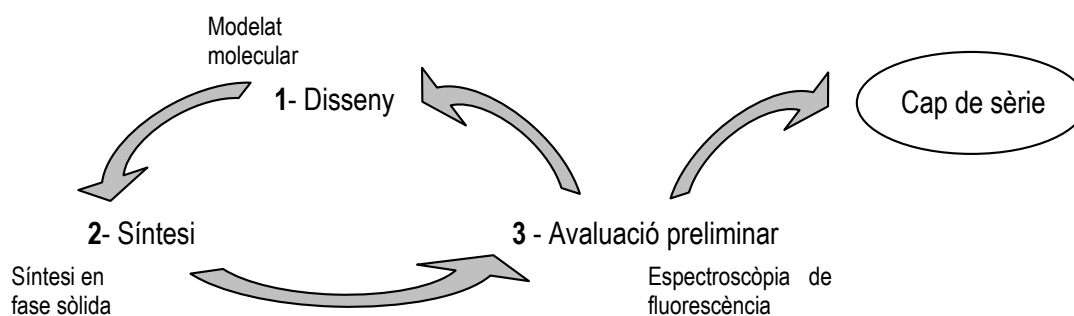


Figura 2.1 Esquema de l'estratègia utilitzada per trobar un lligand peptídic capaç de reconèixer el motiu tetraaniònic de la superfície de la p53_tetS.

2.1.1 INTRODUCCIÓ AL MODELAT MOLECULAR

El modelat molecular es pot definir com la utilització de models matemàtics per mimetitzar el comportament de molècules i/o sistemes moleculars, tant des d'un punt de vista estructural com pel que fa a les seves propietats⁸⁹.

La utilització d'eines de modelat molecular està tenint cada cop un impacte més gran en la química de pèptids i proteïnes⁹⁰, ja que la utilització de simulacions computacionals en alguns casos permet completar els models teòrics basats en dades experimentals. En els darrers anys, hi ha hagut un gran avanç en aquest camp gràcies sobretot al desenvolupament de les eines informàtiques.

Dintre d'aquest camp, en general hi ha tres aproximacions possibles. Primerament, es poden utilitzar càlculs *ab initio*, els quals utilitzen la mecànica quàntica i no inclouen cap paràmetre experimental. Alternativament, per a sistemes més complexos es poden utilitzar els càlculs anomenats semiempírics, que al igual que els *ab initio* utilitzen la mecànica quàntica, però en aquest cas inclouen-hi paràmetres obtinguts experimentalment. Aquest tipus de càlculs, tot i ser molt acurats, per a sistemes grans com les proteïnes, els pèptids, l'ADN, etc. són molt costosos i normalment s'opta per la utilització de càlculs empírics basats en les lleis de la mecànica clàssica. En aquest tipus d'aproximació, es defineixen uns camps de força i el càlcul de l'energia del sistema es realitza a partir de la posició dels diferents àtoms

⁸⁹ Leach, A.R., "Molecular modelling. Principles and applications", Ed. Prentice Hall, Londres, 2001

⁹⁰ Xu, D., Xu, Y. & Uberbacher, E.C., *Curr. Protein and Peptide Science*, (2000), 1, 1-21

en aquest camp. Amb aquest tipus d'aproximació, en alguns casos també es poden arribar a obtenir respostes molt acurades.

En els camps de força utilitzats en la mecànica molecular, bàsicament hi ha quatre contribucions: les distorsions de les distàncies d'enllaç (o "stretchings"), les distorsions dels angles d'enllaç (o "bendings"), les rotacions dels enllaços (o "torsions") i les interaccions no enllaçants (dividides en electrostàtiques i de Van der Waals). En les funcions que defineixen aquestes contribucions hi ha una sèrie de paràmetres els quals es parametrizen empíricament de manera que donin resultats acurats en un gran nombre de sistemes diferents. Així doncs, aquesta transferibilitat de funcions i paràmetres entre sistemes, és una de les principals característiques que ha de tenir un bon camp de força. El principal objectiu és doncs, arribar a tenir un bon compromís entre cost computacional i fiabilitat del resultat.

En la literatura hi ha definits diferents camps de força que han donat bons resultats per a diferents tipus de sistemes (CHARMM⁹¹, AMBER⁹², etc.). En el nostre cas, s'ha utilitzat el camp de força CVFF⁹³ el qual està inclòs en el programa Insight-II® i està parametrizat per reproduir propietats de pèptids i proteïnes.

En general, en tots els camps de força és molt important definir bé tant la hibridació com l'entorn local de cada àtom del sistema, ja que els paràmetres a utilitzar depenen d'aquests factors. A més a més, per a sistemes en els que es vulgui estudiar interaccions de caràcter electrostàtic, també és fonamental definir adequadament quina és la càrrega parcial de cada àtom.

Un altre factor important a tenir en compte en els càlculs en els quals hi ha involucrades interaccions electrostàtiques és la constant dielèctrica. Per defecte, la constant que s'utilitza en el camp de força CVFF és la del buit. En un medi aquós, però, les càrregues queden parcialment apantallades degut a la interacció amb els dipols de les diferents molècules d'aigua. Per intentar mimetitzar aquest efecte hi ha tres opcions. Primerament, es pot substituir el valor de la constant dielèctrica en el buit pel valor en aigua. Aquesta opció, mimetitza força bé la situació en la qual dos àtoms estan allunyats, però no representa tant bé una situació en la qual dos àtoms interaccionen entre si sense que hi quedin molècules d'aigua entremig, ja que en la interfase que hi ha entre aquests dos àtoms, la constant dielèctrica pràcticament és la del buit. Una alternativa és la de treballar en caixes de dissolvent en les quals hi ha molècules d'aigua explícites, però tot i que dóna un resultat més realista, això suposa treballar amb sistemes amb un nombre d'àtoms molt més elevat i per tant té un cost computacional molt més gran. Finalment, com a alternativa intermitja es pot donar a la constant dielèctrica un valor depenent de la distància. Així, en una situació en la que dos àtoms estan allunyats el valor de la constant

⁹¹ Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. & Karplus, M., *J. Comp. Chem.*, (1983), **4**, 187-217

⁹² Weiner, S., Kollman, P., Case, D., Singh, U., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, J. & Weiner, P., *J. Appl. Cryst.*, (1984), **106**, 765-784

⁹³ Maple, J., Dinur, U. & Hagler, A.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1988), **85**, 5350-5354

dielèctrica és més gran, però a la que els dos àtoms es troben propers, el valor de la constant es fa més petit, mimetitzant així la situació que es dona en solució quan dos àtoms interaccionen entre si. En aquest treball, s'ha utilitzat aquesta última opció.

Mitjançant un programa de mecànica molecular, el que realment s'obté com a resultat és un valor d'energia relatiu a un punt zero. Aquest punt zero, correspon a una molècula hipotètica en la qual totes les distàncies d'enllaç, els angles, les torsions i les separacions no enllaçants tenen un valor que no introdueix cap penalització energètica. Pel que fa a les interaccions, l'energia és igual a la diferència d'energies entre les dues espècies aïllades i el complex. Aquesta manera de calcular l'energia dels sistema fa que no es puguin comparar les energies de dos sistemes diferents, sinó que s'hagi de considerar com varia l'energia d'un mateix sistema.

Per dur a terme el disseny i estudi preliminar dels lligands peptídics en aquest treball s'han utilitzat principalment dues eines de modelat molecular: la minimització energètica i l'exploració de l'espai conformacional mitjançant dinàmica molecular.

Per dur terme aquests estudis hi ha diferents programes disponibles tan gratuïts com comercials. En el nostre cas, s'ha utilitzat el programa Insight-II® 95.0 de la companyia Biosym/MSI.

2.1.1.1 Minimització energètica

Per a cada sistema molecular es pot definir una superfície d'energia potencial (o hipersuperfície), la qual representa com varia l'energia potencial del sistema en funció del conjunt de coordenades cartesianes. Excepte en els casos més senzills, aquesta superfície és una funció multidimensional.

En una minimització energètica es parteix d'un conjunt de coordenades i mitjançant petits canvis graduals es van trobant conformacions cada vegada més estables fins que s'arriba a un mínim. El problema de la minimització, és que no permet superar les barreres energètiques i per tant, normalment el que es troba és un mínim local i no el mínim absolut del sistema (figura 2.2). Per poder trobar el mínim absolut s'haurien de realitzar diferents minimitzacions partint de diferents estructures.

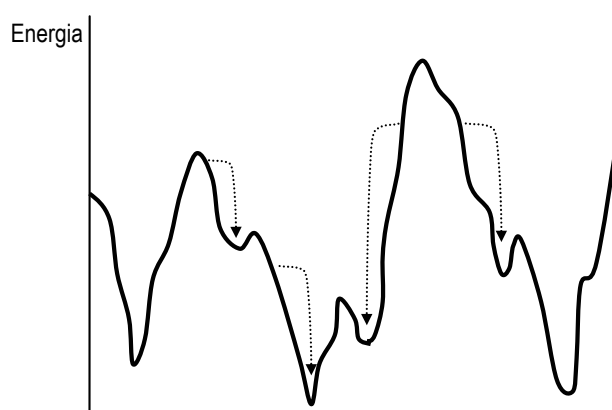


Figura 2.2 Representació esquemàtica d'una superfície d'energia potencial monodimensional. Cada fletxa representa la minimització que es duria a terme en funció del punt de partida.

En les minimitzacions realitzades, s'ha utilitzat una combinació de dos mètodes: el “steepest descent” i el “conjugate gradient”. La diferència entre els dos mètodes es basa en com varien les coordenades entre dos passos successius de la minimització. El “steepest descent” funciona molt bé quan s'està lluny del mínim, de manera que s'ha utilitzat en el refinament inicial de l'estructura. Quan s'està proper del mínim, però, funciona millor el “conjugate gradient”, de manera que s'ha utilitzat aquest per fer el refinament final.

En aquest treball s'han utilitzat les minimitzacions per a dos objectius. D'una banda, s'han utilitzat per comprovar que les conformacions proposades per als diferents pèptids dissenyats no eren desfavorables i de l'altra, s'han utilitzat dintre dels càlculs d'exploració de l'espai conformacional.

2.1.1.2 Dinàmica molecular

En un càlcul de dinàmica molecular el que es fa, és assignar velocitats inicials a l'atzar a cadascun dels àtoms del sistema seguint una distribució de Boltzmann per a una temperatura donada. A partir d'aquí es van generant conformacions successives mitjançant la integració de les lleis de Newton, obtenint-se una trajectòria que especifica com varien les posicions i les velocitats dels àtoms del sistema al llarg del temps.

Els càlculs de dinàmica molecular han estat àmpliament utilitzats per estudiar els processos dinàmics que es donen en algunes proteïnes⁹⁴. D'altra banda, però, les simulacions de dinàmica molecular també poden ser molt útils per dur a terme una exploració de l'espai conformacional. Una forma habitual, és

⁹⁴ Moraitakis, G., Purkiss, A.G. & Goodfellow, J.M., *Rep. Prog. Phys.*, (2003), **66**, 383-406

realitzar una dinàmica a temperatura molt alta, físicament poc realista. L'energia cinètica extra del sistema, li permet superar les barreres energètiques de la superfície d'energia potencial. Així, durant el transcurs de la dinàmica es van seleccionant i minimitzant algunes estructures, fet que permet obtenir un "mapa" de la superfície de potencial (figura 2.3).

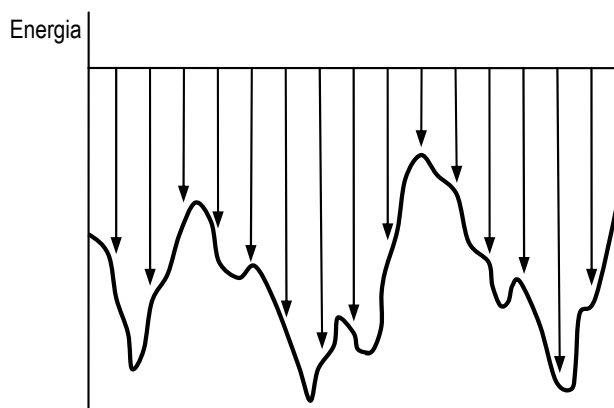


Figura 2.3 Representació d'una exploració conformacional d'una superfície d'energia potencial mitjançant una simulació de dinàmica molecular. En minimitzar (fletxes), s'obté la corresponent energia potencial.

A la pràctica però, per a pèptids i proteïnes, l'elevat nombre de dimensions que té la superfície d'energia potencial fa que sigui difícil trobar amb un sol càlcul de dinàmica molecular el mínim absolut del sistema. Una possibilitat, és realitzar dinàmiques successives, és a dir, durant un cert interval de temps es van minimitzant les estructures obtingudes al llarg de la trajectòria. Passat aquest interval de temps, s'agafa l'última de les estructures minimitzades i se li assigna un nou conjunt de velocitats. A partir d'aquesta segona trajectòria s'obtenen les noves estructures, i el cicle es va repetint tantes vegades com sigui convenient. Aquesta metodologia permet dur a terme una exploració més efectiva de l'espai conformacional.

En aquest treball, s'han utilitzat els càlculs de dinàmica molecular per tal de fer avaluacions preliminars de la possible interacció entre els diferents pèptids dissenyats i el domini de tetramerització de la p53. Per tal de tenir una idea d'aquesta interacció, s'han realitzat exploracions de l'espai conformacional durant 150ps. En la figura 2.4 es pot veure l'esquema dels càlculs utilitzats. S'han utilitzat 3 cicles successius de 50ps en els quals s'ha "escalfat" el sistema a 600K. Cada 1ps, s'han anat minimitzant les estructures resultants obtenint-se en total 150 estructures.

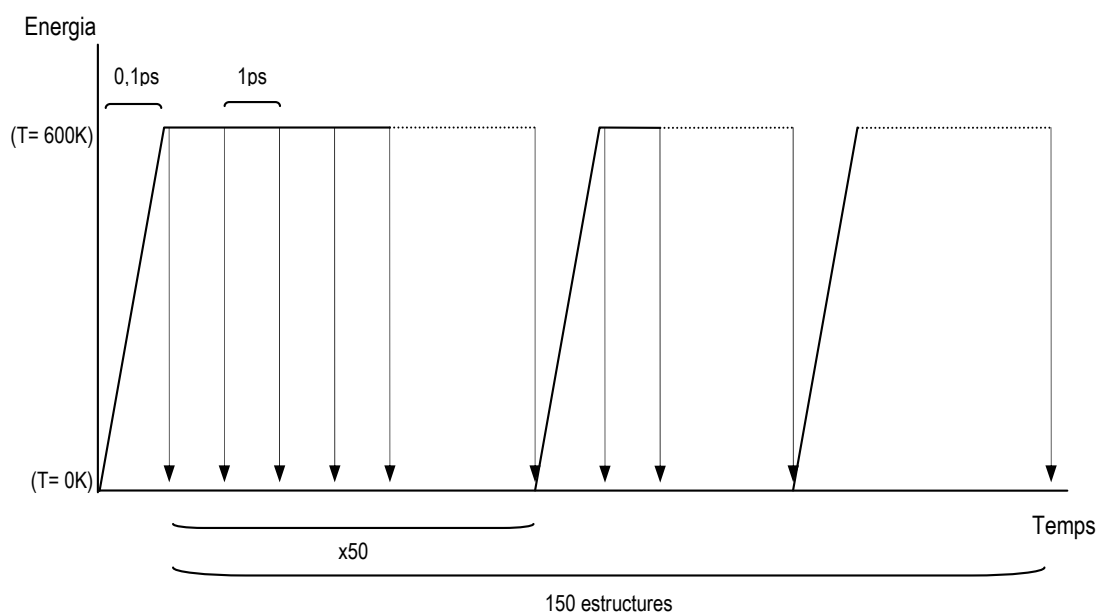


Figura 2.4 Esquema dels càlculs de dinàmica molecular realitzats.

Com a punt de partida del càlcul s'han utilitzat estructures amb el pèptid a estudiar situat molt a prop del motiu tetraaniònic d'un dels monòmers del domini de tetramerització de la p53. Per afavorir aquesta situació, s'han utilitzat minimitzacions energètiques en les quals s'hi ha inclòs una penalització energètica molt elevada si la distància entre el carboni del grup carboxilat i el carboni del grup guanidini és diferent a 4\AA (figura 2.5). Aquesta distància afavoreix tant les interaccions electrostàtiques com la formació d'enllaços d'hidrogen⁹⁵. Així, s'han obtingut estructures en les quals cadascuna de les arginines està aparellada amb un dels residus àcids del motiu tetraaniònic. Aquestes estructures, s'han tornat a minimitzar sense la introducció de cap penalització i posteriorment s'han utilitzat com a punt de partida dels càlculs de dinàmica molecular.

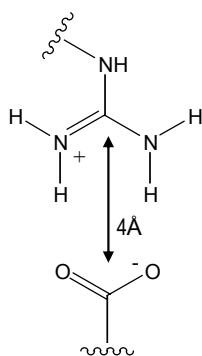


Figura 2.5 Esquema de la restricció introduïda en la preparació dels sistemes per a fer l'avaluació mitjançant dinàmica molecular.

⁹⁵ Ciani, B., Jourdan, M. & Searle, M.S., *J. Am. Chem. Soc.*, (2003), **125**, 9038-9047

En el càlcul de dinàmica molecular, s'ha deixat evolucionar lliurement al pèptid, però s'han fixat tots els àtoms del domini de tetramerització de la p53 excepte els de les cadenes laterals dels quatre residus àcids (E343, E346, E349 i D352). Si no es fes això, a 600K es perdria tota l'estructura de la proteïna.

Una altra alternativa per trobar el mínim absolut, podria ser utilitzar un càlcul de dinàmica molecular "simulated annealing". En aquest tipus de càlcul s'intenta mimetitzar el procediment de construcció de materials mitjançant el qual una determinada substància es deixa refredar lentament fins que cristal·litza en un cristall únic. En el cas del càlcul computacional, "s'escalfa" el sistema a una temperatura que permeti superar les barreres energètiques i posteriorment es va disminuint progressivament aquesta temperatura. Per garantir que es troba el mínim absolut, s'haurien de realitzar infinits passos de temperatura i en cada un d'ells el sistema hauria d'assolir l'equilibri tèrmic. A la pràctica, això és difícil de simular de manera que el millor és fer varies simulacions i comprovar si s'arriba al mateix resultat.

2.1.2 INTRODUCCIÓ A LA FLUORESCÈNCIA

Hi ha molècules que passen a un estat excitat mitjançant l'absorció de llum. Des d'aquest estat excitat aquestes molècules retornen a l'estat fonamental mitjançant l'emissió de llum de més baixa energia (i per tant a una longitud d'ona més alta). La diferència d'energia entre el feix d'excitació i el d'emissió, és deguda al fet que dintre l'estat excitat, la molècula es relaxa fins al nivell vibracional de més baixa energia, i és des d'aquest nivell que retorna a l'estat fonamental mitjançant l'emissió de llum (figura 2.6)⁹⁶. Tot aquest procés es coneix com a fluorescència i s'anomenen fluoròfors els grups que són fluorescents. L'eficiència de la fluorescència es coneix com rendiment quàntic.

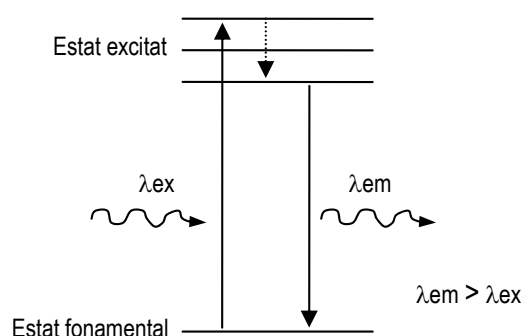


Figura 2.6 Representació esquemàtica del fenomen de la fluorescència.

⁹⁶ Lakowicz, J.R., "Principles of fluorescence spectroscopy", Ed. Plenum Press, New York, 1986

La fluorescència normalment es mesura mitjançant un detector situat en angle recte al feix d'excitació. Així doncs, la mesura es realitza respecte l'absència de llum (fons fosc) i per tant, hi ha una elevada sensibilitat. Si es pensa en espectroscòpia d'UV-Visible, la sensibilitat és molt més baixa perquè la mesura es basa en la variació de la intensitat d'un feix de llum i per tant, està molt més subjecte a la influència del soroll.

La fluorescència és una propietat que depèn molt de l'entorn, i per això ha estat àmpliament utilitzada per estudiar la interacció entre molècules⁹⁷. A més a més, l'elevada sensibilitat permet treballar a concentracions molt baixes (μM o menys), i això permet arribar a determinar afinitats molt elevades. D'altra banda, la fluorescència presenta altres grans avantatges, com són que la mesura es fa en solució, que les quantitats necessàries per fer l'estudi són petites i que s'estudia l'equilibri de forma directe.

Malgrat que la intensitat de la fluorescència és proporcional a la intensitat del feix d'excitació, no es pot compensar indefinidament el fet de treballar a concentracions més baixes mitjançant la utilització de feixos d'excitació més intensos. Això és així principalment per dues raons:

- a- El dissolvent dispersa una mica de llum. Aquest fenomen es coneix com dispersió Rayleigh quan és produït a la mateixa longitud d'ona que el feix d'excitació i dispersió Raman quan es produït a longituds d'ona superiors.
- b- El compost es pot degradar per fotòlisi.

2.1.2.1 Fluorescència i proteïnes

Entre els aminoàcids naturals n'hi trobem tres que són intrínsecament fluorescents: la fenilalanina, la tirosina i el triptòfan. En solució, els espectres d'emissió de cadascun d'aquests aminoàcids és diferent observant-se els màxims a 282, 303 i 348 respectivament. Pel que fa a l'absorció a 280nm, es pot veure que en una proteïna pràcticament només es deu al Trp i a la Tyr. D'altra banda, el rendiment quàntic de la Phe és molt més baix que el de la Tyr i el Trp⁹⁸ (figura 2.7).

⁹⁷ Eftink, M.R., *Method Enzymol.*, (1997), **278**, 221-257

⁹⁸ Teale, F.W.J. & Weber, G., *Biochem. J.*, (1957), **65**, 476-482

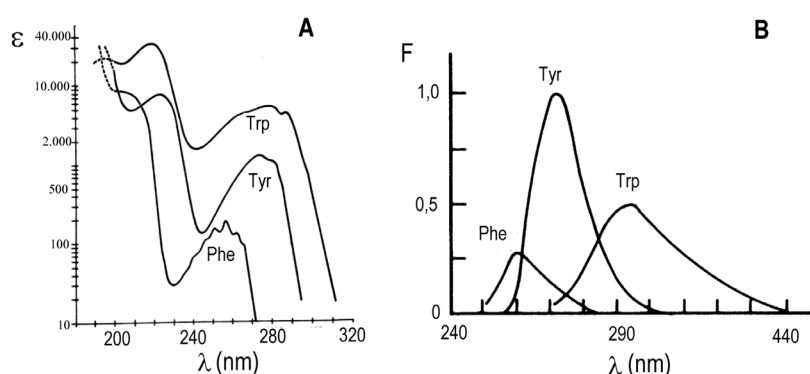


Figura 2.7 Espectres d'absorció (A) i d'emissió (B) dels aminoàcids fluorescents.

Si s'analitza però, la fluorescència de les proteïnes, es pot veure que en la majoria de casos aquesta està bàsicament dominada pel Trp. Tot i que una tirosina aïllada té rendiments quàntics en solució similar als del triptòfan, en moltes proteïnes es troba que la seva fluorescència és clarament més baixa. La principal explicació a aquest fenomen, la trobem en el fet que en aquests casos normalment el protó fenòlic de la tirosina està formant algun enllaç d'hidrogen amb altres grups de la proteïna. Aquest tipus d'interacció n'augmenta el pKa, desplaçant així l'equilibri fenol-fenòxid cap a la forma protonada. El menor grau de conjugació de la forma fenòlica provoca una disminució del rendiment quàntic⁹⁹.

En el cas que la fluorescència deguda a la Tyr no està disminuïda, encara es pot diferenciar la fluorescència deguda al Trp mitjançant una excitació selectiva a longituds d'ona iguals o superiors a 295nm.

Els estudis de fluorescència han estat àmpliament utilitzats en l'estudi de proteïnes. Els camps principals on s'ha utilitzat, són en els estudis de plegament i en els estudis d'interacció amb diferents lligands. En el cas dels estudis de plegament, s'aprofita que la variació de la fluorescència està relacionada amb la variació de l'entorn del fluoròfor (normalment Trp), per determinar les velocitats i els possibles mecanismes d'aquest plegament¹⁰⁰.

En el cas dels estudis d'interacció hi ha dues alternatives clares. D'una banda es pot mesurar com varia la fluorescència de la proteïna a mesura que s'hi addiciona un lligand. De l'altra, mitjançant la utilització de lligands amb grups fluoròfors es pot estudiar la interacció a partir de la variació de la fluorescència d'aquest lligand.

⁹⁹ Teale, F.W.J., *Biochem. J.*, (1960), **76**, 381-388

¹⁰⁰ Sridevi, K. & Udgaonkar, J.B., *Biochemistry*, (2002), **41**, 1568-1578

En aquest tipus d'estudi les variacions que es poden observar són:

- a) *Disminució de la banda de fluorescència degut a un "quenching" (o desactivació)*. Aquest fenomen es dona com a conseqüència del retorn del fluoròfor a l'estat fonamental a causa de col·lisions amb altres molècules presents a la solució. Alternativament també es pot produir degut a un canvi de la polaritat de l'entorn i/o accessibilitat del dissolvent.
- b) *Desplaçament de la banda d'emissió*. Per exemple, en el cas del triptòfan, quan aquest està "enterrat" en el interior d'una proteïna, el màxim d'emissió es desplaça cap a longituds d'ona més baixes.
- c) *Variació de la intensitat de fluorescència degut a una transferència d'energia*. La transferència d'energia, es dona en alguns casos en els quals hi ha una superposició en els espectres d'absorció de dos fluoròfors. En aquesta situació, pot passar que quan un dels dos fluoròfors passi a l'estat excitat degut a l'absorció de llum i mitjançant interaccions dipol-dipol amb l'altre fluoròfor li transfereixi part de l'energia, provocant que aquest segon fluoròfor passi a l'estat excitat. Aquest fenomen depèn de la distància entre els dos fluoròfors.
- d) *Variació en l'anisotropia*. L'anisotropia o polarització, dona informació de la mobilitat del fluoròfor. Aquesta mobilitat depèn, per exemple, de la mida i la forma de les molècules, i de la rigidesa de l'entorn del propi fluoròfor. Per tant, si una molècula petita s'uneix a una macromolècula, és probable que hi hagi una variació en el valor de l'anisotropia. Aquesta, es mesura a partir de la fluorescència en funció del pla de polarització del feix d'excitació i del feix d'emissió.

Tots aquests tipus de variacions, s'han aprofitat en l'estudi de processos de reconeixement¹⁰¹.

2.1.2.2 Fluorescència i p53_tetS

La p53_tetS, presenta en la seva seqüència tres Phe i una Tyr. L'espectre de fluorescència està, però, clarament dominat per la Tyr. En un principi es podria plantejar l'opció de utilitzar possibles variacions en la seva fluorescència per estudiar l'afinitat amb lligands peptídics. El problema, però, és que aquesta Tyr es troba lluny del motiu tetraaniònic, fet que fa que sigui poc probable que la seva fluorescència es vegi afectada per la unió d'un lligand en aquesta zona.

Alternativament es pot plantejar la utilització d'un lligand fluorescent. En aquest sentit, es podrien incorporar al pèptid un gran nombre de fluoròfors diferents, com per exemple la fluoresceïna. En aquest treball s'ha cregut més adient la utilització del triptòfan ja que tot i tenir un rendiment quàntic més baix

¹⁰¹ Croce, K., Freedman, S.J., Furie, B.C. & Furie, B., *Biochemistry*, (1998), **37**, 16472-16480

que molècules com la fluoresceïna, presenta tota una sèrie d'avantatges. Primer, és menys voluminós i així s'evita que dificulti la interacció per impediments estèrics. Segon, en ser un aminoàcid natural el podem incorporar en qualsevol punt de la seqüència utilitzant els procediments estàndards de síntesi de pèptids. Per últim, utilitzant una longitud d'ona d'excitació de 295nm podem excitar selectivament aquest triptòfan sense que s'afectin les tirosines de la p53_tetS.

Així doncs, s'ha decidit incorporar el triptòfan en la seqüència dels pèptids dissenyats per a reconèixer el motiu tetraaniònic del domini de tetramerització de la p53.

2.2 APROXIMACIÓ HELICOÏDAL

En l'anàlisi de l'estructura de proteïnes, es pot observar que les interaccions entre hèlixs- α són molt habituals¹⁰². L'exemple més clar el trobem en el cas dels "coiled-coils" i els feixos d'hèlixs ("helix bundles")¹⁰³. En aquest tipus d'estructura dues o més hèlixs interaccionen formant estructures superenrotllades. La interacció, bàsicament es dona a través de la formació d'un nucli hidrofòbic entre les hèlixs i el posicionament dels residus polars a les parts exposades al dissolvent. Tot i aquesta disposició, en aquest tipus d'estructura les interaccions electrostàtiques en alguns casos també hi tenen un gran importància¹⁰⁴.

Avui en dia es disposa d'abundants eines fiables per al disseny d'hèlixs- α , i de fet, en la literatura s'hi poden trobar exemples de la seva utilització com és el cas del disseny *de novo* de petits dominis proteics¹⁰⁵. Tenint en compte tot això, i l'elevada propensitat de les arginines per formar hèlixs- α , la primer disseny realitzat en aquest treball ha estat basat en la utilització d'un pèptid amb estructura d'hèlix- α .

¹⁰² Cohen, C. & Parry, D.A.D., *Science*, (1994), **263**, 488-489

¹⁰³ Khon, W.D. & Hodges, R.S., *TIBTECH*, (1996), **16**, 379-389

¹⁰⁴ Yu, Y., Monera, O.D., Hodges, R.S. & Privalov, P.L., *Biophysical Chemistry*, (1996), **59**, 299-314

¹⁰⁵ Imperiali, B. & Ottesen, J.J., *J. Peptide Res.*, (1998), **54**, 177-184

2.2.1 DISSENY

2.2.1.1 Plantejament inicial

Les primeres consideracions que s'han tingut en compte en el disseny, han estat les següents:

- En la p53_tetS s'ha vist que els quatre residus àcids estan distribuïts en una periodicitat $i / i+3$, en la qual els carboxilats queden separats per una distància d'uns 7-8Å. Aquesta distància, és més curta del que caldria esperar per a un hèlix- α canònica. Si es planteja l'estructura d'una hèlix- α canònica, amb les quatre arginines col·locades en diferents periodicitats, es pot veure que la situació que millor pot encaixar amb la p53_tetS, és aquella en la que les arginines estan col·locades en $i / i+4$. En aquesta situació els grups guanidini de les arginines queden separats per uns 8Å. Al contrari del que es podria preveure, en una periodicitat $i / i+3$ de les arginines, els grups guanidini queden separats per quasi 10Å.
- La resta de residus que queden exposats en la zona del motiu tetraaniònic de la superfície de la p53_tetS són de caràcter fonamentalment hidrofòbic. Per això, la resta de residus que a priori quedaran en la interfase entre el pèptid i la p53_tetS, s'han d'escollir de caràcter hidrofòbic, afavorint així, els contactes tipus "coiled-coil".
- Els residus que teòricament quedaran exposats al dissolvent, han de ser de caràcter polar i tamany petit. Així s'afavoreix una bona solvatació, al mateix temps que s'evita que dificultin la interacció per impediments estèrics.
- Per poder diferenciar els diferents residus en els estudis de RMN, s'ha de procurar que els residus repetits es trobin en entorns diferents.
- Els diferents residus han de tenir una elevada propensitat a formar hèlix- α ¹⁰⁶.
- S'ha d'acetilar l'extrem N-terminal i amidar l'extrem C-terminal, per tal d'evitar que hi hagin altres càrregues a part de les dels grups guanidini de les arginines.

Tenint en compte aquestes consideracions, s'ha arribat a un primer disseny (Candidat 1) amb la l'estructura primària indicada en la figura 2.8.

¹⁰⁶ Creighton, T.E., "Proteins. Structures and molecular properties" (2nd Ed), W.H. Freeman and Co., New York, 1993, p. 256

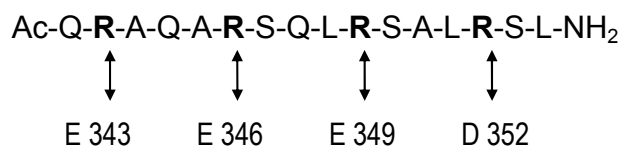


Figura 2.8 Seqüència del Candidat 1 amb els aparellaments previstos en aquest disseny.

2.2.1.2 Optimització del disseny

Per poder a dur a terme els estudis d'interacció mitjançant mesures de fluorescència, en el disseny s'hi ha afegit un triptòfan. Considerant l'orientació teòrica del pèptid respecte la p53_tetS, s'ha situat el Trp en l'extrem N-terminal per tal de minimitzar possibles impediments estèrics. A més a més, per tal d'afavorir que la seva fluorescència es vegi afectada en el cas que hi hagi interacció amb la p53_tetS, aquest Trp s'ha de situar en una posició que quedi en la interfase entre el pèptid i la proteïna. Per tenir aquesta situació, la millor posició és en i-3 respecte la primera arginina.

Per tal d'acabar d'optimitzar l'estructura i l'helicitat del pèptid, s'han tingut en compte unes últimes consideracions basades en les propensitats en funció de la posició en la seqüència¹⁰⁷ i la utilització de programes de predicció d'helicitat (AGADIR¹⁰⁸):

- L'asparagina, és una bona iniciadora d'hèlix- α .
- La glicina és força freqüent en l'extrem C-terminal. A més a més no crea impediments estèrics.
- Amb el triptòfan en l'extrem N-terminal, per tal de poder induir l'helicitat s'ha d'introduir un espaiador d'alanines.
- S'ha vist que dues serines consecutives, poden provocar distorsions en les hèlixs¹⁰⁹. Per aquesta raó se n'ha substituït una per un altre residu polar i petit com és l'asparagina.

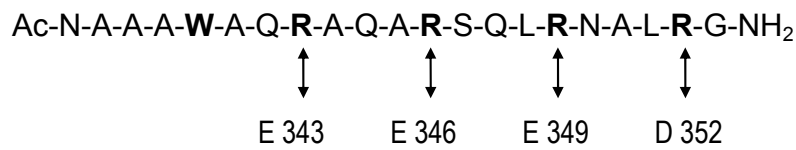
Amb totes aquestes consideracions s'ha pogut augmentar un 10% l'helicitat teòrica del pèptid. Finalment com a aproximació helicoïdal, s'ha arribat al Candidat 2 (figura 2.9).

¹⁰⁷ Richardson, J.S. & Richardson, D.C., *Science*, (1988), **24**, 1648-1652

¹⁰⁸ Lacroix, E., Viguera, A.R. & Serrano, L., *J. Mol. Biol.*, (1998), **284**, 173 (<http://www.embl-heidelberg.de/Servicegh>)

¹⁰⁹ Royo, M., Contreras, M., Giralte, E., Albericio, F. & Pons, M., *J. Am. Chem. Soc.*, (1998), **120**, 6639

A



B

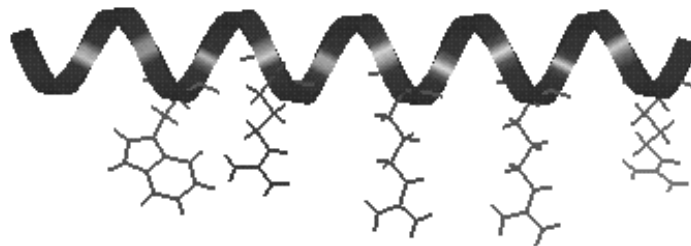


Figura 2.9 A - Seqüència del Candidat 2 amb els aparellaments previstos en el disseny.

B – Representació del Candidat 2 en hèlix- α canònica (només hi ha representades les cadenes laterals de les arginines i del triptòfan).

2.2.1.3 Avaluació *in silico* (MD-SA)

En una dinàmica molecular realitzada amb el Candidat 2 tot sol i partint d'una estructura d'hèlix- α canònica, es pot veure que al cap d'un temps es produeix una desestructuració clara de l'hèlix. Això és degut principalment a la forta repulsió que es produeix entre les quatre arginines, ja que es troben en el mateix costat de l'hèlix.

En l'avaluació en presència de p53_tetS, com a punt de partida, es pren una estructura d'hèlix α canònica per al Candidat 2 on s'han aparellat les arginines i els carboxilats dels quatre residus àcids de la p53_tetS a una distància de 4Å. En resum, el que es pot veure, és que en la zona del mínim energètic, la distància entre els grups guanidini de les arginines i els carboxilats dels residus àcids de la p53_tetS es manté força propera a la inicial, excepte per l'aparellament E343-R8. D'altra banda, però, l'estructura del pèptid perd l'helicitat inicial (figura 2.10).

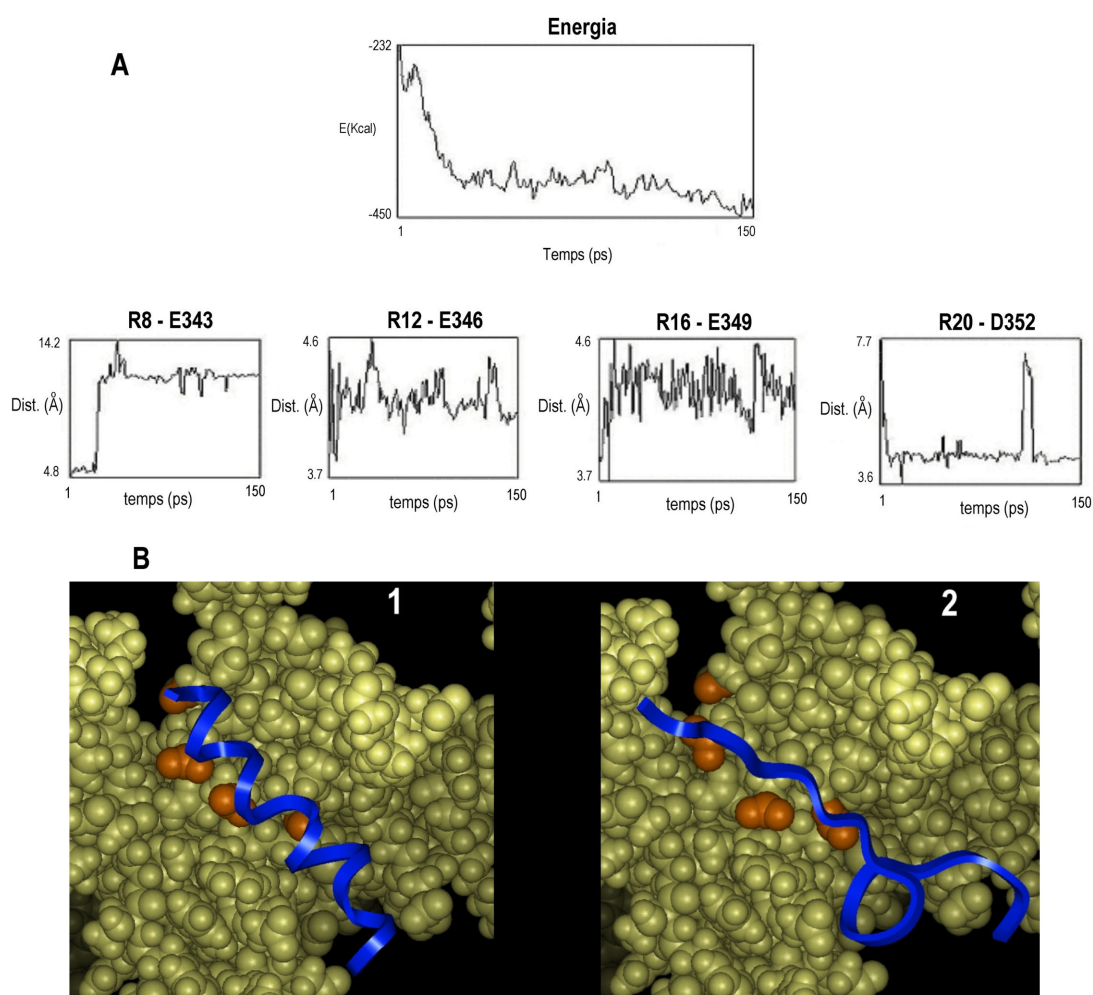


Figura 2.10 Resultat de l'avaluació mitjançant dinàmica molecular. **A** – Variació de l'energia total del sistema i de la distància de cadascun dels aparellaments durant la simulació. **B** – Comparació entre: 1 - estructura de partida i 2 – estructura obtinguda en la zona del mínim energètic (només hi ha representat l'esquelet del pèptid).

Tot i el resultat confús de l'avaluació mitjançant dinàmica molecular, s'ha decidit tirar endavant la síntesi del Candidat 2 per tal d'avaluar experimentalment si hi ha interacció amb la p53_tetS.

2.2.2 SÍNTESI

La síntesi del Candidat 2, s'ha realitzat mitjançant síntesi automàtica seguint l'estratègia de protecció Boc/Bzl. En l'etapa de purificació, ha estat necessari dur a terme una re-purificació, fet que ha provocat una notable disminució del rendiment global de síntesi i purificació.

Segons l'anàlisi per HPLC (figura 2.11), finalment s'ha obtingut el grau de puresa adequat per a dur a terme els experiments de fluorescència.

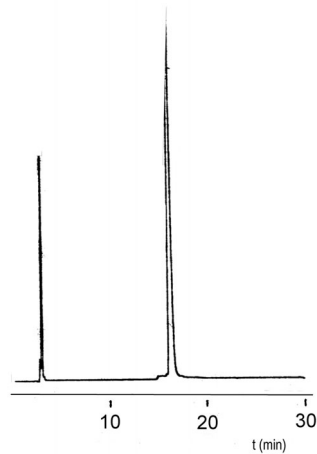


Figura 2.11 HPLC del Candidat 2 purificat.
Gradient: 15-45% B
Temps de retenció: 16,8 min

En l'anàlisi per espectrometria de masses, s'ha observat un pic minoritari a $M + 114$, el qual podria correspondre a una petita impuresa de pèptid amb doble incorporació d'asparagina. En l'anàlisi d'aminoàcids, s'hi ha detectat un lleuger excés d'aspàrtic que probablement es deu a aquesta doble incorporació. Tot i això, es pot concloure que s'ha obtingut el pèptid Candidat 2 amb un grau de puresa suficient i un rendiment final de síntesi i purificació del 6%.

2.2.3 AVALUACIÓ PRELIMINAR

Per tal d'avaluar la interacció entre el pèptid Candidat 2 i la p53_tetS, s'han comparat els espectres de fluorescència de tres solucions diferents amb la mateixa quantitat de pèptid i concentracions creixents de p53_tetS en tampó fosfat 25mM pH 7 (figura 2.12).

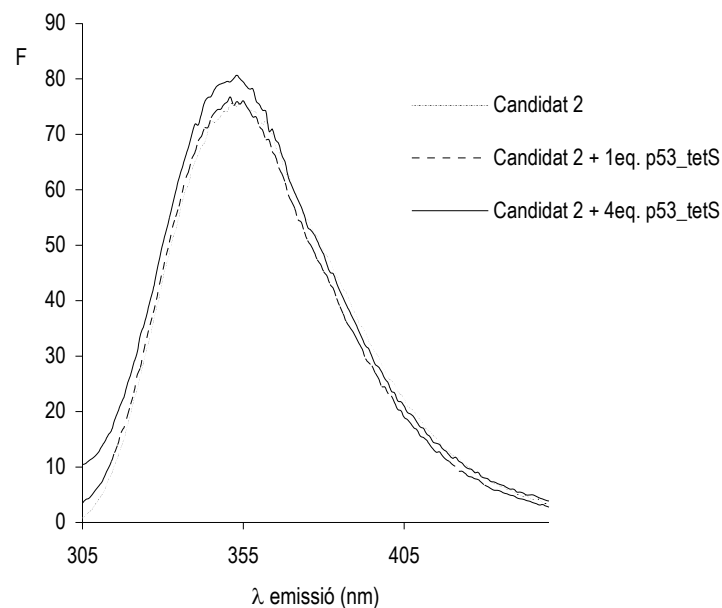


Figura 2.12 Espectres d'emissió de solucions de Candidat 2 amb concentracions creixents de p53_tetS.

No s'ha observat cap variació significativa ni en la intensitat de la fluorescència, ni en la forma de la banda ni en la posició del màxim. De la mateixa manera, tampoc s'han observat diferències en el valor d'anisotropia.

En les condicions de treball pràcticament només s'excita el triptòfan del pèptid. Tot i això, utilitzant una λ d'excitació de 295nm hi ha una lleugera excitació de les tirosines de la p53_tetS, causant del lleu augment de fluorescència que es produeix amb concentracions creixents de p53_tetS.

2.2.4 CONCLUSIÓ

Malgrat que hi ha la possibilitat que realment hi hagi interacció entre el Candidat 2 i la p53_tetS, sembla poc probable que aquesta es pugui donar sense que s'afecti la fluorescència del triptòfan. A més a més, els resultats de l'avaluació mitjançant dinàmica molecular, també indiquen que és poc probable que el pèptid Candidat 2 sigui capaç de reconèixer la p53_tetS.

Les causes principals d'aquesta absència d'afinitat poden ser:

- 1) El pèptid és massa voluminós.
- 2) La repulsió electrostàtica que es produeix entre les cadenes laterals de les arginines evita que el pèptid adopti la conformació d'hèlix- α necessària.

2.3 APROXIMACIÓ LINEAL

2.3.1 DISSENY

Donat el resultat obtingut amb el disseny helicoïdal, s'ha plantejat la possibilitat d'utilitzar pèptids més petits per a dur a terme el reconeixement. Mitjançant dissenys basats en una conformació estesa, es poden obtenir pèptids més petits amb les arginines situades a una distància teòrica força favorable per poder interaccionar simultàniament amb els quatre residus àcids de la superfície de la p53_tetS.

2.3.1.1 Plantejament inicial

Les consideracions principals que s'han tingut en compte en aquest disseny són:

- En una disposició alternada, s'aconsegueix que les arginines quedin orientades cap al mateix costat. A més, tenint en compte la separació entre els grups guanidini en pèptids model, la millor situació és quan les diferents arginines estan en $i / i+2$.
- Al contrari del que s'ha plantejat per al disseny helicoïdal, en aquest cas es busca que l'únic contacte pèptid-proteïna es dongui entre les arginines i els residus àcids corresponents. Per això, la resta d'aminoàcids de la seqüència han de ser el menys voluminosos possible.
- Un pèptid més petit és més difícil que adopti una determinada estructura secundària en solució. Malgrat això, s'escullen la resta de residus de la seqüència procurant que globalment el pèptid no tingui una elevada propensitat per a cap estructura secundària en concret.
- Per poder diferenciar els diferents residus en els estudis de RMN, s'ha de procurar que els residus repetits es trobin en entorns diferents.
- S'ha d'acetilar l'extrem N-terminal i amidar l'extrem C-terminal, per tal d'evitar que hi hagin altres càrregues a part de les dels grups guanidini de les arginines.

Tenint en compte aquestes consideracions, s'ha arribat a un primer disseny (Candidat 3) amb la l'estructura primària indicada en la figura 2.13



Figura 2.13 Seqüència del Candidat 3.

2.3.1.2 Optimització del disseny

Per tal de poder dur a terme els estudis de fluorescència, en aquest disseny també s'hi ha afegit un triptòfan. Per afavorir que en el cas que hi hagi interacció la fluorescència del Trp es vegi afectada, s'ha situat en $i-2$ respecte la primera arginina.

Per poder dur a terme estudis de ressonància de plasmó superficial es necessita una amina lliure per poder immobilitzar el pèptid covalentment. Per aquesta raó, s'ha decidit deixar una fracció del pèptid amb l'extrem N-terminal lliure. Per evitar que la zona d'interacció formada per les quatre arginines quedi massa propera a la superfície dels xips que s'utilitzen normalment en ressonància de plasmó superficial, a l'extrem N-terminal s'ha introduït una cua de residus utilitzant els criteris descrits anteriorment.

Finalment, com aproximació lineal, s'ha arribat al Candidat 4 (figura 2.14)

A

Ac-A-G-A-A-G-W-A-R-G-R-A-R-S-R-NH₂

B

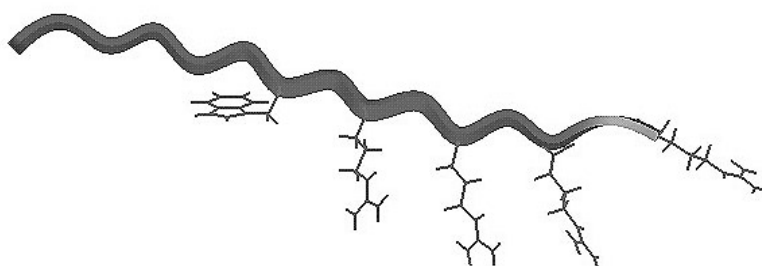


Figura 2.14 A - Seqüència del Candidat 4 **B** – Representació de l'estructura resultant d'una minimització del Candidat 4 en una conformació estesa ideal (només hi ha representades les cadenes laterals de les arginines i del triptòfan).

2.3.1.3 Avaluació *in silico* (MD-SA)

En aquest cas, com a punt de partida de la dinàmica molecular, s'ha utilitzat una estructura lineal on s'han aparellat les arginines amb els carboxilats dels quatre residus àcids de la p53_tetS a una distància de 4Å. En el cas de l'aproximació helicoïdal, el disseny del pèptid s'ha basat en una orientació concreta respecte el domini de tetramerització de la p53. En el cas de l'aproximació lineal, però, en el disseny del pèptid no s'ha considerat cap orientació concreta, de manera que en el càlcul, de les dues orientacions possibles s'ha escollit arbitràriament la que produeix els següents aparellaments: R8-D352, R10-E349, R12-E346 i R14-E343.

Com a resum, el que podem veure és que, a diferència del primer disseny, en aquest cas en arribar a la zona del mínim energètic, la distància entre els carboxilats i els guanidinis es manté propera als 4Å inicials en els quatre aparellaments. A més a més, la conformació de la zona on hi ha les arginines també es manté força bé (figura 2.15)

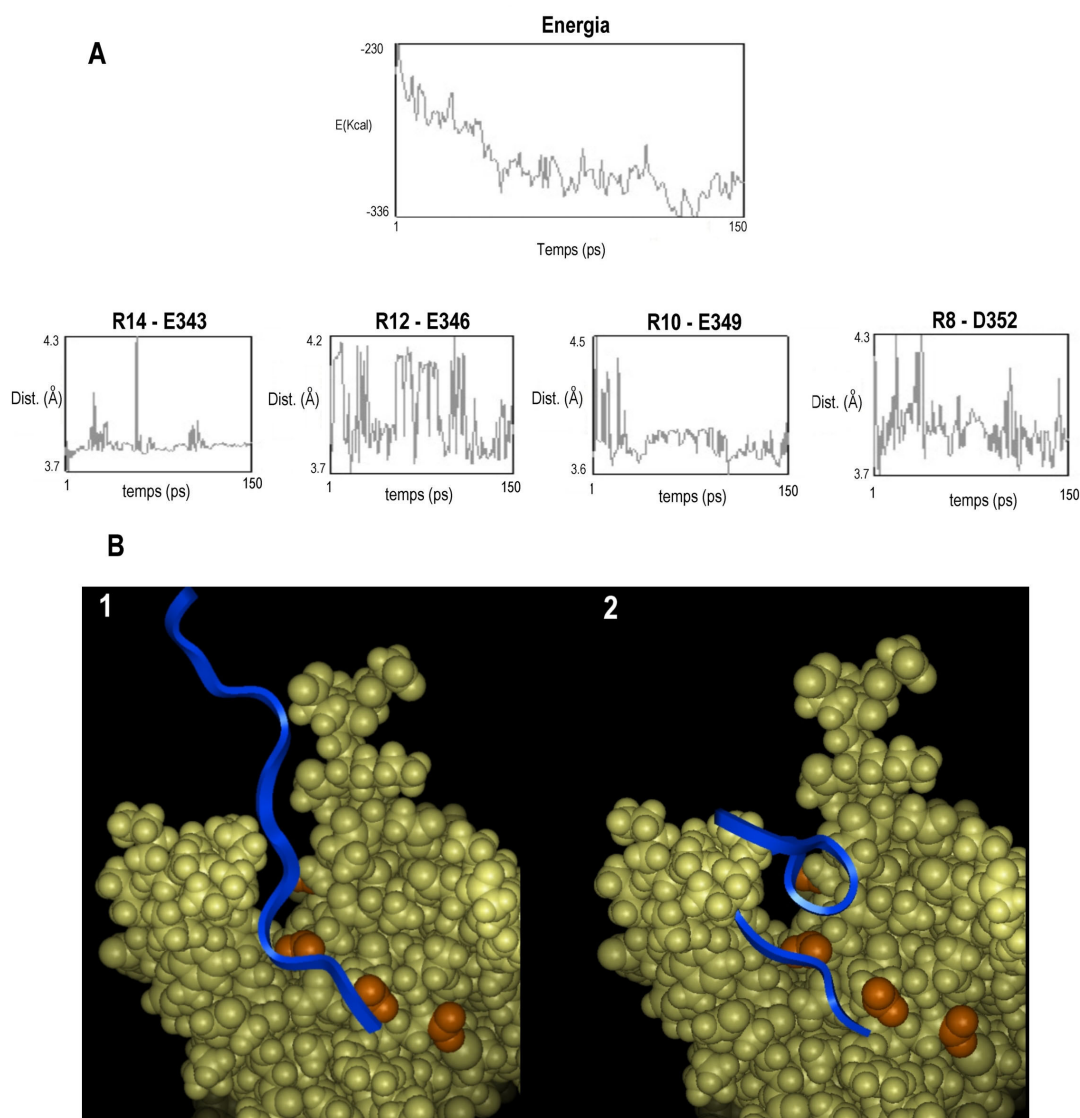


Figura 2.15 Resultat de l'avaluació mitjançant dinàmica molecular. **A** – Variació de l'energia total del sistema i de la distància de cadascun dels aparellaments durant la simulació. **B** – Comparació entre: 1 - estructura de partida i 2 – estructura obtinguda en la zona del mínim energètic (només hi ha representat l'esquelet del pèptid).

Aquest resultat és més encoratjador que l'obtingut per al primer disseny, i per això s'ha decidit tirar endavant amb la síntesi.

2.3.2 SÍNTESI

La síntesi del Candidat 4, s'ha realitzat mitjançant síntesi automàtica seguint l'estratègia de protecció Boc/Bzl. Només s'ha acetilat l'extrem N-terminal del 60% de la peptidil-resina. La resta s'ha obtingut en forma d'amina lliure per poder dur a terme els estudis de ressonància de plasmó superficial.

Segons l'anàlisi per HPLC (figura 2.16), finalment s'ha obtingut el grau de puresa adequat tant per al pèptid Ac-Candidat 4 (extrem N-terminal acetilat) com per al pèptid H-Candidat 4 (extrem N-terminal lliure).

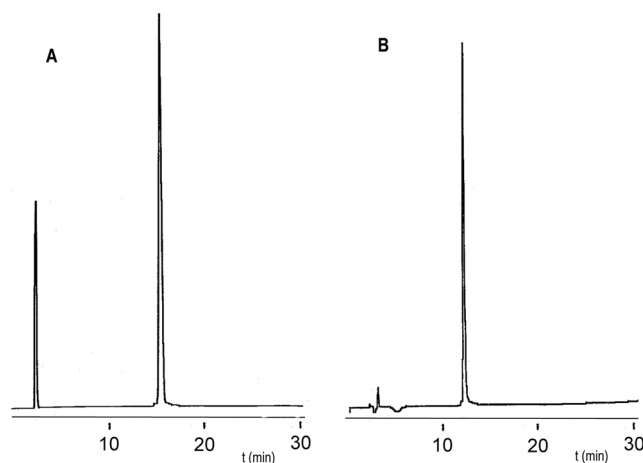


Figura 2.16 A -HPLC de l'Ac-Candidat 4 purificat.

Gradient: 10-35% B

Temps de retenció: 15,5min

B - HPLC del H-Candidat 4 purificat.

Gradient: 10-35% B

Temps de retenció: 12,1min

En ambdós casos la massa trobada coincideix amb la calculada. Mitjançant anàlisi d'aminoàcids, s'ha pogut determinar un rendiment global de síntesi i purificació del 26% per l'Ac-Candidat 4 i del 37% pel H-Candidat 4.

2.3.3 AVALUACIÓ PRELIMINAR

Per tal d'avaluar la interacció entre el pèptid Candidat 4 i la p53_tetS, s'han comparat els espectres de fluorescència de quatre solucions diferents amb la mateixa quantitat de pèptid i concentracions creixents de p53_tetS en tampó fosfat 25mM pH 7. Al contrari de l'observat pel Candidat 2, en aquest cas hi ha una disminució de la intensitat de la fluorescència a mesura que s'augmenta la concentració de p53_tetS. Així, amb 4 equivalents de p53_tetS la fluorescència disminueix quasi el 35%. No s'observen, però, variacions en l'anisotropia.

Per tal de dur a terme una anàlisi més acurada, s'ha mesurat la fluorescència d'una mateixa solució del pèptid Candidat 4 a mesura que s'hi addicionen fins a 3,5 equivalents de p53_tetS. Per tal d'evitar una dilució massa gran de la mostra, s'ha utilitzat una solució concentrada de p53_tetS, i s'han fet addicions d'entre 2 i 10 μ l.

L'anàlisi s'ha realitzat en tampó fosfat 25mM pH 7 i a 25°C. Per assegurar l'equilibrat del sistema s'ha deixat un interval de 5 minuts entre cada addició i la següent mesura. La temperatura s'ha mantingut constant mitjançant la utilització d'un bany extern.

En la figura 2.17, es pot veure com a mesura que augmenta la concentració de p53_tetS hi ha una clara disminució de la intensitat de fluorescència en l'espectre d'emissió. Aquest fet suggereix que el pèptid Candidat 4 interacciona amb el domini de tetramerització de la p53.

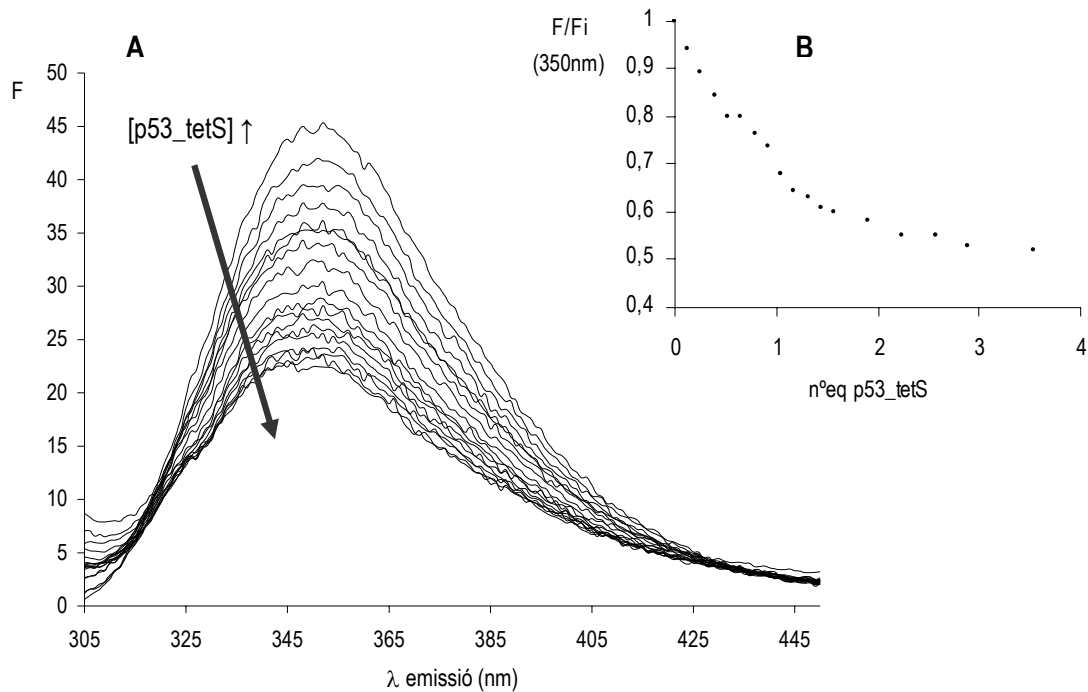


Figura 2.17 A - Espectres d'emissió d'una solució de Candidat 4 amb concentracions creixents de p53_tetS.

B – Variació de la intensitat de fluorescència a 350nm.

Per tal de comprovar que aquesta variació en la fluorescència és deguda a la interacció entre el pèptid i la p53_tetS i no a algun altre fenomen, s'ha dut a terme un assaig similar però utilitzant una proteïna que a priori no hagi d'ésser reconeguda pel Candidat 4.

Com a control negatiu, idealment s'hauria d'utilitzar una proteïna pràcticament idèntica a la p53_tetS convenientment mutada per que no presentés el motiu tetraaniònic. Degut a l'excessiva dificultat d'obtenir-la, també es podria pensar en una proteïna globular, que no tingui triptòfan i amb un pes molecular i un punt isoelèctric similars als de la p53_tetS. En el nostre laboratori, no es disposa de cap proteïna d'aquestes característiques. Del que sí es disposa, és de la proteïna Ubiquitina. Aquesta és una proteïna de 8565 Da i pl 6,7. Tot i no ser el control negatiu ideal, s'ha considerat que és prou adequat per comprovar si l'efecte observat al addicionar p53_tetS és degut a la interacció amb el Candidat 4.

Per dur a terme el control, s'ha analitzat la fluorescència de mostres amb 5 i 10 equivalents d'Ubiquitina en tampó fosfat 25mM pH 7. Degut a la presència de Tyr i Phe en la seqüència d'aquesta proteïna i al gran excés utilitzat, s'ha detectat un lleuger increment de la fluorescència i ha estat necessari preparar mostres amb la mateixa concentració d'Ubiquitina però sense pèptid. La fluorescència residual d'aquestes solucions s'ha restat de la de les mostres amb pèptid, observant-se

així que pràcticament no hi ha cap variació en els espectres d'emissió (figura 2.18). La petita oscil·lació observada, segurament és deguda a l'error experimental provocat per no treballar amb la temperatura controlada a 25°C.

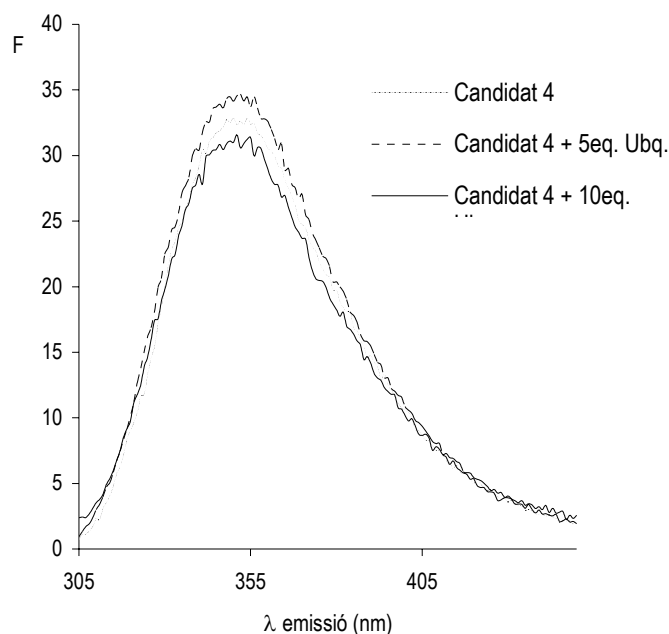


Figura 2.18 Espectres d'emissió de diferents solucions de Candidat 4 amb concentracions creixents d'ubiquitina (Ubq).

2.3.4 SÍNTESIS POSTERIORIS

En el transcurs d'aquest treball s'ha hagut de tornar a sintetitzar el pèptid Candidat 4. En funció de la tècnica utilitzada, ha estat necessari introduir diferents modificacions en l'extrem N-terminal. Així s'ha tornat a sintetitzar el pèptid acetilat, el pèptid amb l'extrem N-terminal lliure i els pèptids amb biotina o carboxifluoresceïna (CF) en l'extrem N-terminal.

En aquest cas la síntesi s'ha realitzat manualment seguint l'estratègia Fmoc/tBu. S'ha fet una sola preparació que en l'última etapa, mitjançant suspensions en DMF, s'ha al·licotat en quatre parts iguals per tal d'obtenir cada una de les versions del pèptid Candidat 4.

Després de la purificació s'han obtingut tots els pèptids amb un grau de puresa adequat per dur a terme els estudis d'interacció amb la p53_{tetS}. En tots els casos la massa trobada coincideix amb la calculada (figura 2.19).

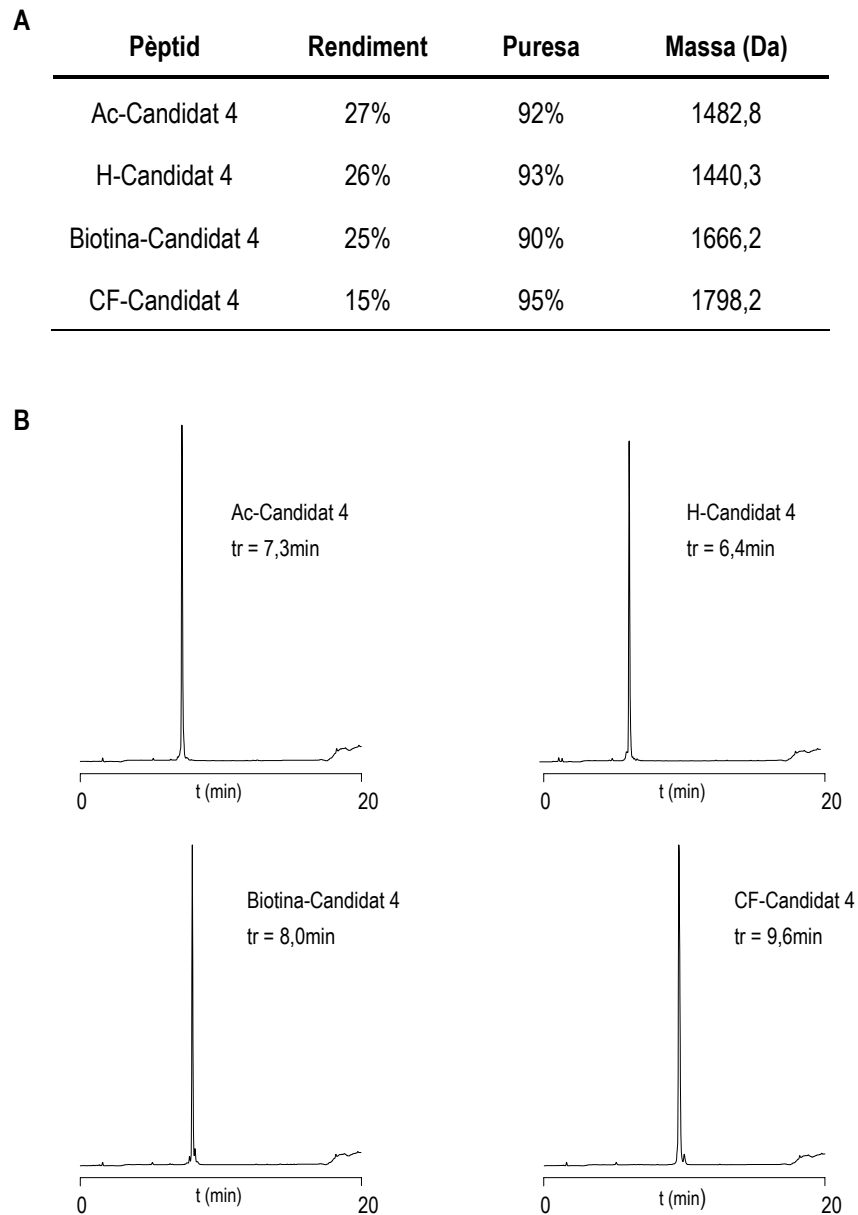


Figura 2.19 A – Taula amb el rendiment global, grau de puresa i massa trobada per a cadascun dels pèptids.

B- HPLC de cadascun dels pèptids purificats. Gradient: 0-50%B en 15min.

