

Biofísica i immunoteràpia contra el càncer

Interacció entre cèl·lules T i hidrogels sintetitzats amb heparina

Maximilià Soler i Subirana

1497326

Treball supervisat per Jordi Faraudo, científic titular a l'ICMAB

Treball de Fi de Grau en Física
Convocatòria pel Juliol de 2023



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

Departament de Física

Barcelona, Espanya

15 de Setembre de 2022

Biofísica i immunoteràpia contra el càncer

Interacció entre cèl·lules T i hidrogels sintetitzats amb heparina

Maximilià Soler i Subirana

Resum

Sumari

1	Introducció i objectius	3
1.1	Motius	3
1.2	Procediments	3
1.3	Electrostàtica	3
1.4	Especialització d'aquest treball	4
2	Mètode	5
2.1	Programari	5
2.2	Equació de Poisson-Boltzmann	5
3	Resultats	5
3.1	Sel·lecció del model proteic	5
3.2	Càlcul electrostàtic superficial de la proteïna	6
4	Conclusions i comentari final	7
A	Apèndix	8
A.1	Bibliografia	8
A.2	Annexos	9
A.2.1	Estudi i sel·lecció del millor model virtual	9
A.2.2	Obtenció dels arxius per l'APBS	11
A.3	Índex alfabètic	13
A.4	Declaracions	14
A.4.1	Declaració d'autoria del Treball de Fi de Grau	14
A.4.2	Declaració d'Extensió del Treball de Grau	15
A.4.3	Declaració Supervisió Treball de Grau	16

1 Introducció i objectius

Des del redescobriment modern del càncer i el seu progressiu augment de casos durant els últims dos segles, diferents mètodes per a tractar-lo han anat apareixent i sent modificats fins a arribar a un percentatge d'èxit prou satisfactori. No obstant, seria desitjable, com amb totes les malalties, poder reduir la mitjana de derrotes vora el zero. És per això que, diferents camps crucials de la ciència, s'uneixen per a trobar el millor mètode possible per a solucionar aquest problema.

En el present treball enfoquem un dels mètodes que, avui dia, semblen ser els que poden tenir una taxa d'èxit més elevada durant els pròxims anys. Aquest és l'anomenat *immunoteràpia*.

1.1 Motius

Ja sigui per diversos factors nocius, com ara fumar, beure, exposició a certs agents contaminants o simplement per una desafortunada genètica, la normal formació de cèl·lules pot veure's afectada. Quan una cèl·lula rep el senyal que està malformada, acostuma a entrar al cicle d'apoptosis, on s'encarrega de la seva pròpia mort per a protegir l'organisme. No obstant, si aquesta prèvia malformació afecta la part dels gens que s'encarreguen d'aquest cicle, aquesta cèl·lula perd la capacitat d'eliminar-se a si mateixa i se segueix reduplicant. Quan això succeeix, es crea un tumor, que és l'anomenat càncer.

Ara bé, molt abans que tot això passi, tenim unes cèl·lules especialitzades (entre moltes altres funcions) en aquest tipus de malformacions, anomenades cèl·lules T, que són creades, entrenades i multiplicades a la melsa, el timus i els nostres ganglis limfàtics. Tot i així, de vegades patim el càncer ja que les nostres pròpies cèl·lules no són completament efectives, és a dir, tenim un petit percentatge d'error com amb tots els tractaments actuals.

D'aquí sorgeix la idea de la immunoteràpia. Si fossim capaços d'entrenar nosaltres mateixos aquestes cèl·lules, podríem reduir aquest marge d'error, i fer molt més efectiu el tractament contra el càncer sense patir gairebé efectes secundaris, evitant per tant els agressius tractaments que són actualment la radio i quimioteràpia.

1.2 Procediments

Mitjançant extraccions de sang i després els corresponents mètodes separadors de tipus de cèl·lules (afèresi), és possible aïllar una col·lecció de cèl·lules T del pacient el qual volem tractar. En comptes d'utilitzar recipients coneguts com la placa de Petri (considerat un mètode bidimensional), el que volem és cultivar aquestes cèl·lules de forma tridimensional. Aquestes necessiten un entorn similar al d'un gangli per a poder multiplicar-se, que anomenem matriu extracel·lular. Un cop s'han seleccionat adequadament, es comprova que responguin adequadament a les proteïnes del càncer i que siguin prou efectives. Finalment, aquestes cèl·lules són retornades al pacient per a lluitar contra el tumor en qüestió.

En tractar-se de cèl·lules del propi pacient, la taxa de rebuig és mínima, pel que normalment té una eficiència molt superior a la dels altres mètodes més agressius.

1.3 Electrostàtica

Dins les cèl·lules tenim una quantitat inimaginable de macromolècules i altres components repartides pel medi intracel·lular. Aquestes, formades per diferents parts unides per diversos tipus d'enllaços, poden perdre algunes zones connectades feblement al cos principal. Aquests elements, generalment àtoms, solen abandonar electrons a l'estructura principal d'on s'han separat, que transforma aquesta en una molècula carregada negativament, anomenada macroió. És per això que diem que aquesta molècula queda carregada. Els àtoms que han marxat s'anomenen contraions, ja que la suma de totes les seves càrregues cancel·la la del macroió.

Aquests àtoms generalment se separen a causa de l'entropia, però sorgeix un problema: d'on treuen l'energia per a marxar més lluny. Dins els medis cel·lulars que volem estudiar, acaba passant un fenomen conegut com a capa difusa de càrrega. En altres paraules, els àtoms formen una espècie de núvol que rodeja el macroió, generalment a una distància de pocs nanòmetres, que cancel·la la càrrega més enllà d'aquests, creant una càrrega total neutra vista des de fora.

Per tant, dos macroions només interactuen a distàncies suficientment properes i, a més, han d'encaixar geomètricament per a poder transpassar aquesta capa exterior i poder sentir el potencial elèctric l'un de l'altre. Diem que es tracten d'estructures estereoespecífiques. Per a solucionar aquest problema, és a dir, determinar el potencial a la superfície d'aquests macroions, farem servir l'equació de Poisson-Boltzmann, explicada més endavant a la secció de Mètodes.

1.4 Especialització d'aquest treball

Finalment doncs, aquest treball rau en la creació d'un àmbit quasi-perfecte per a aquestes cèl·lules i la seva reproducció. Necessitem generar un entorn gairebé idèntic al de l'interior d'un gangli limfàtic. Per a aconseguir-ho, s'han d'analitzar les proteïnes que s'encarreguen de vincular la cèl·lula a les *parets* del gangli, per a així determinar-ne la interacció electroestàtica i poder decidir el millor mètode per a produir-lo.

En el nostre cas, es fa servir un hidrogel creat principalment amb heparina i un químic anomenat polietilenglicol per a simular aquest entorn del gangli limfàtic. Als resultats experimentals duts a terme al laboratori, s'ha descobert que certa proteïna localitzada dins els gànglis limfàtics, la CCL21, amb una càrrega de 17.0eV a pH 7, té la taxa de reproducció de cèl·lules T més elevada en aquest hidrogel. Això condueix a pensar que aquesta proteïna té una gran interacció electrostàtica amb l'heparina, que serà un dels principals punts del present treball. A més, ens interessarà saber si només es tracta d'una interacció de tipus electrostàtic, o si de fet n'hi ha d'altres tipus que no hem tingut en compte. Finalment, preguntar-nos si sense la heparina, hi hauria la mateixa resposta amb altres hidrogels.

Investigarem doncs, les principals interaccions entre aquests dos elements, els càlculs electroestàtics que les fan possibles i el model més adient per a representar aquestes molècules en format digital, fent ús del programa VMD, que serveix per a visualitzar i analitzar proteïnes de forma digital.

2 Mètode

2.1 Programari

En aquest treball el programa clau a utilitzar serà l'anomenat VMD (Visual Molecular Dynamics) que ens servirà per a visualitzar les molècules que desitgem estudiar. Els detalls sobre com utilitzar-lo i les seleccions que realitzem es troben a l'annex.

2.2 Equació de Poisson-Boltzmann

El mètode de Poisson-Boltzmann ens permet determinar la càrrega de potencial a la superfície desitjada, amb els paràmetres que hom decideix. Partint d'un potencial amb canvi de superfície, suposem que tenim una pàgina (2D) amb una densitat de càrrega superficial uniforme ($-\sigma_q$) contra un volum amb densitat de càrrega $\rho_q(x)$. Suposant que es tracta d'un camp elèctric uniforme en direcció a l'eix x, tenim que el camp és:

$$\mathcal{E}_{sup} = \frac{-\sigma_q}{\varepsilon} \quad (1)$$

D'aquí podem deduir que:

$$\frac{d\mathcal{E}}{dx} = \frac{\rho_q}{\varepsilon} \quad (2)$$

Que ens serveix per a càrregues superficials de volums. Amb això premeditat, comencem a idear com trobar la càrrega superficial del nostre macroió: ens adonem que necessitem saber la càrrega dels contraions i el macroió, que aquesta depèn, alhora, de la posició i càrregues de la resta. Decidim doncs establir una mitjana aproximada de la densitat de càrrega volumètrica, $\langle \rho_q \rangle$. El potencial que aquesta crea l'anomenem el camp mitjà (mean field), i l'escribim com a $V(x)$.

Volem doncs saber la concentració de contraions, i.e. $c_+(x)$. Ho aproximem com si ens trobéssim en aigua pura, que condueix a $c_+(x) = c_0 e^{-eV(x)/k_B T}$, amb la coneguda distribució de Boltzmann. Recordem que $\mathcal{E} = -dV/dx$, que ens duu a l'equació de Poisson $\frac{d^2 V}{dx^2} = -\rho_q/\varepsilon$.

Establint $c_+(x) = \rho_q/\varepsilon$, $l_B = e^2/4\pi\varepsilon k_B T$ (Longitud de Bjerrum en aigua) i $\bar{V} = eV(x)/k_B T$, podem trobar que:

$$\frac{d^2 \bar{V}}{dx^2} = -4\pi l_B c_0 e^{-\bar{V}} \quad (3)$$

Que anomenarem equació de Poisson-Boltzmann per a la superfície que ens interessa analitzar. Aquesta equació, com que acostuma a ser no-lineal i per tant irresoluble manualment, la calcularem de forma numèrica amb l'aplicació APBS (Automatic Poisson-Boltzmann Solver) al VMD. Consultar annexos per a més informació.

3 Resultats

3.1 Selecció del model proteic

La proteïna que desitgem estudiar és la CCL21. Al *Protein Databank*, lloc on s'emmagatzemen les estructures moleculars de forma digital, hi trobem dos models: 2L4N i 5EKI. En comparar les estructures, veiem que el model més eficient és el 5EKI, més concretament la cadena E (ja que en presenta 6). Per al procés seguit en la comparació, consultar els annexos.

La comparació més important a destacar és la presència, en aquest segon model, dels aminoàcids del 70 cap endavant, que resulten ser el punt clau d'interacció d'aquesta proteïna amb la CCR7, la que presenten les cèl·lules T que volem estudiar a les seves capes. L'aparença d'aquesta molècula és la següent:

Un cop estudiat aquest model amb el programari VMD, procedim a calcular-ne el potencial electrostàtic amb l'APBS.

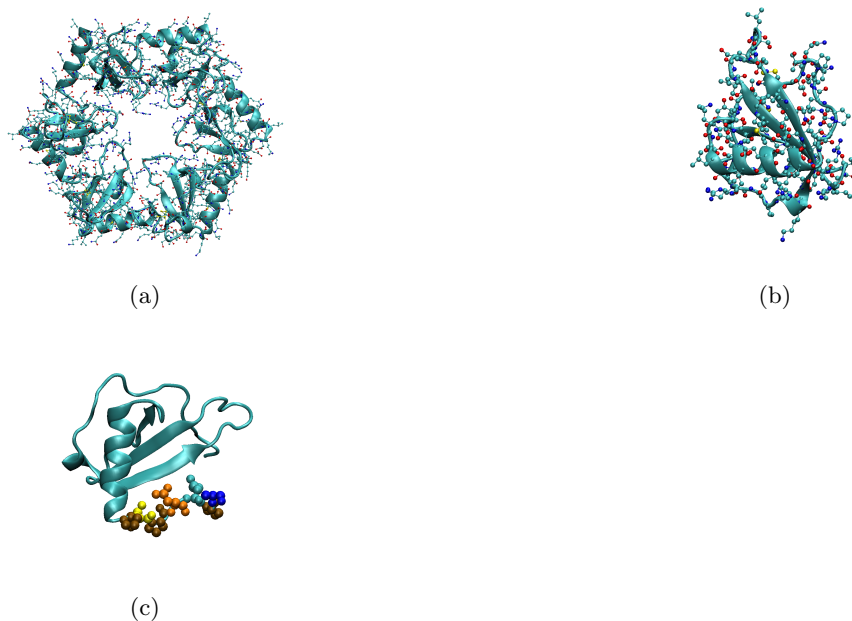


Figure 1: (a) Estructura general del model 5EKI, que presenta sis cadenes similars a causa del mètode d'obtenció de cristal·lografia de rajos X. (b) Cadena E del model acabat de mencionar, que considerem el model més bo (veure Annex). (c) Terminal C d'aquest model, lloc crucial per a la interacció amb la proteïna CCR7.

3.2 Càlcul electrostàtic superficial de la proteïna

Mitjançant l'APBS resollem les equacions de Poisson-Boltzmann mencionades a la secció anterior. És interessant recalcar les condicions prèvies establertes. Establim unes concentracions de 0.100M Na⁺ i igual per Cl⁻. Col·locant una temperatura de 298.15K (T ambient) i comparant-la amb 309.65 (T mitjana del cos humà), una permeabilitat del medi de 78.54 i un pH de 7.0, trobem les següents figures:

Cal recalcar que hem obtingut aquesta imatge fent servir un rang de potencials de -7 a 7 en unitats de kT/e, ja que la càrrega total de tots els components d'aquesta proteïna és de 7kT/e.

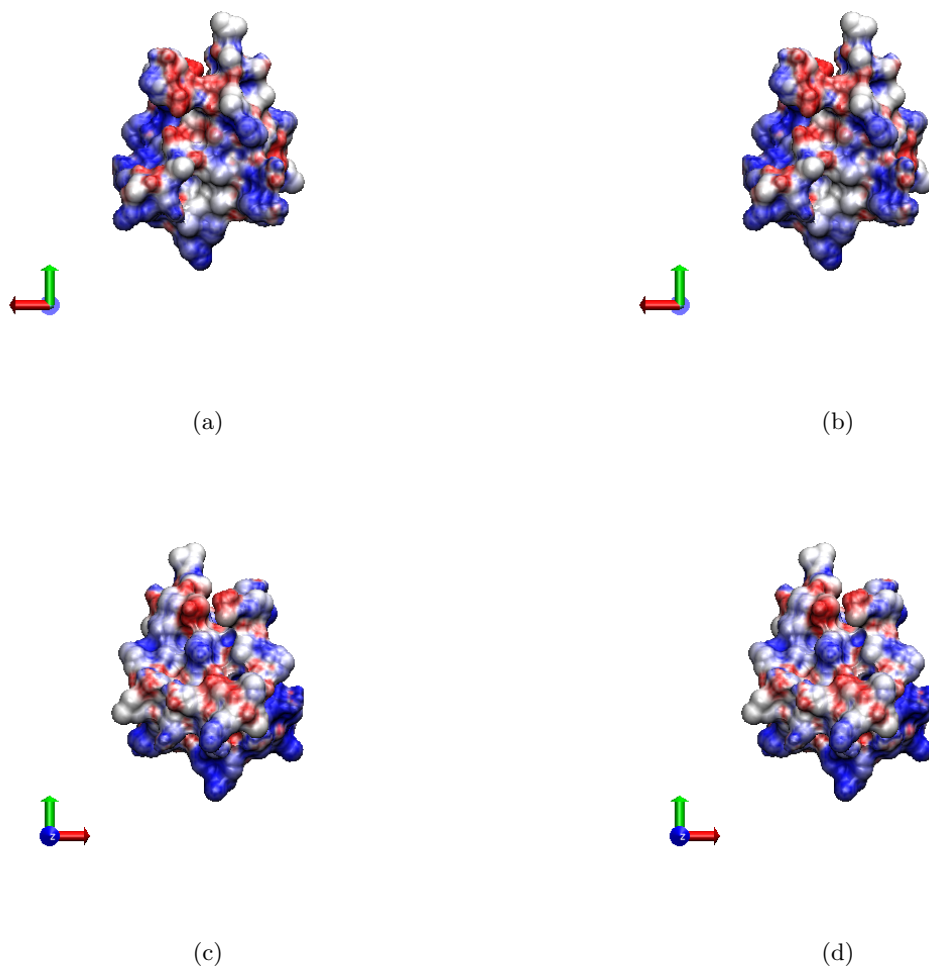


Figure 2: (a) Aspecte general del potencial superficial de la proteïna a T ambient. (b) Aspecte a T del cos (36,5°C). (c) Aspecte a T ambient, rotat 180° a l'eix y. (d) Aspecte a T corporal, rotat 180° a l'eix y.

4 Conclusions i comentari final

A Apèndix

A.1 Bibliografia

A.2 Annexos

A.2.1 Estudi i selecció del millor model virtual

En fer ús del programa VMD, haurem d'utilitzar models virtuals de proteïnes principalment del *Protein Databank*, on hi ha emmagatzemades les que ens interessa estudiar. El primer model seleccionat per a estudiar és l'anomenat 2L4N, de la proteïna CCL21 com s'ha esmentat abans.

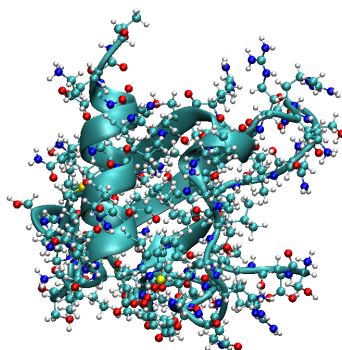


Figure 3: Estructura general del model 2L4N

La determinació de l'estructura d'aquesta proteïna s'ha realitzat mitjançant el mètode NMR (Nuclear Magnetic Resonance), que consisteix en col·locar la proteïna en un camp magnètic potent i constant mentre els seus àtoms són afectats per un altre camp magnètic feble i oscil·lant. En llegir la freqüència obtinguda d'aquest procés, se'n poden determinar els elements i molècules (aminoàcids) d'aquesta proteïna de manera força eficient.

En analitzar aquesta proteïna, descobrim que el model virtual només inclou els 70 primers aminoàcids, mentre menciona que en falten uns 40 a la terminal C.

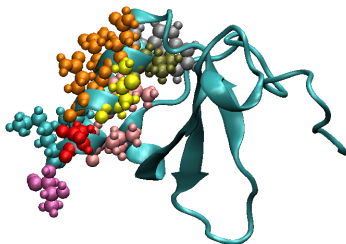


Figure 4: Terminal C del model 24LN (59 a final)

És interessant revisar el document adjunt ja que ens menciona els llocs d'unió (*binding sites*) de la proteïna CCL21 amb la CCR7, que és la proteïna localitzada a la capa més exterior de les cèl·lules T que facilita la interacció electrostàtica i és d'estudi primordial en aquest treball, ja que d'elles depèn el possible cultiu en 3D al laboratori. En són els següents:

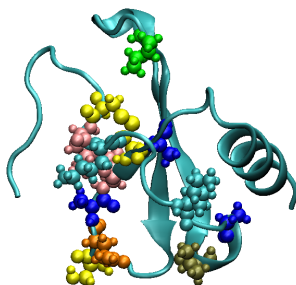


Figure 5: Residus 9-11, 16, 19, 21, 36, 47-50, 52 i 53 del model 2L4N

En descobrir la manca d'aminoàcids a la terminal C, decidim cercar si existeix un model virtual amb més aminoàcids determinats a la terminal C ja que són crucials a l'hora de la interacció amb l'heparina, perquè s'ha demostrat que el motiu pel qual la proteïna CCL21 atrau tan eficientment les cèl·lules T és gràcies a aquesta terminal que altres similars menys eficients no contenen. Trobem un model força interessant, de la mateixa proteïna CCL21, anomenat 5EKI, que s'ha determinat mitjançant cristal·lografia rajos X.

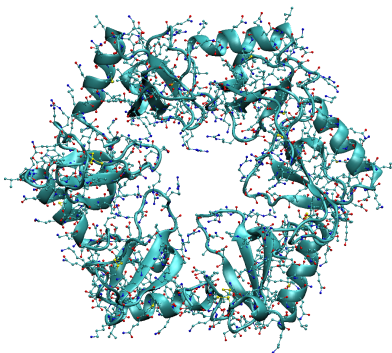


Figure 6: Estructura general del model 5EKI

Troblem que el model conté 6 formes de la mateixa proteïna (a causa de la cristal·lografia), pel que decidim buscar quina és la més adient. Finalment veiem que la cadena E no conté cap col·lisió entre àtoms (el model no té àtoms massa a prop entre ells que puguin causar problemes a l'hora de calcular interaccions) i a més és el que menys residus mancants proporciona. Decidim doncs utilitzar aquesta cadena per a l'estudi.

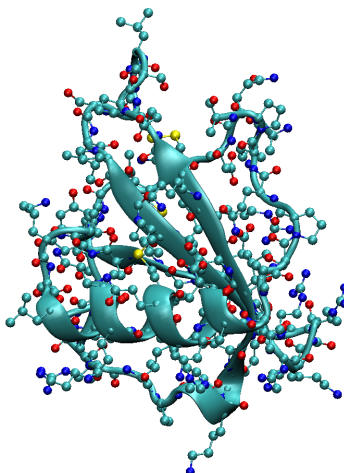


Figure 7: Cadena E del model 5EKI

Fent un cop d'ull al document adjunt d'aquest model veiem que menciona que els aminoàcids de la terminal C a partir del 70 fins el 79, són de gran importància en la interacció d'aquesta proteïna, els quals el model 2L4N no conté. Finalment, decidim doncs que el model 5EKI és el que ens interessa utilitzar per a l'estudi, tot i no contenir els 5 primers aminoàcids de la terminal N, que de moment, considerem no-crucials per als càlculs que ens interessin realitzar.

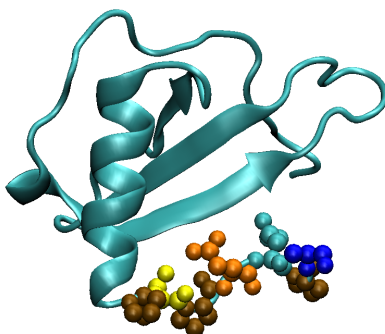


Figure 8: Terminal C (70-79) de la cadena E (5EKI)

Per a acabar de comparar i descartar el millor model, fem servir l'eina *MultiSeq* al VMD que ens compara l'estructura dels dos models de la proteïna.

A.2.2 Obtenció dels arxius per l'APBS

Per al correcte estudi i càlculs amb el model escollit, hem de perfeccionar la nostra proteïna, és a dir, afegir-hi els elements que puguin faltar-hi. En general solen faltar només àtoms d'hidrogen, però decidim fer-ho amb el VMD mitjançant uns arxius de topologia que l'ajuda a interpretar cada aminoàcid de la proteïna i determinar quins elements falten.

A més, un cop obtinguda aquesta nova estructura, utilitzarem el programa *PDB2PQR* que ens permet proporcionar una càrrega i un radi a cada element de la proteïna amb el pH desitjat. Amb tot això podem procedir a utilitzar el programa APBS, que ens proporcionarà una imatge tridimensional del potencial a la superfície d'aquesta proteïna.

A.3 Índex alfabètic

A.4 Declaracions

A.4.1 Declaració d'autoria del Treball de Fi de Grau

Jo, Maximilià Soler Subirana, amb Document Nacional d'Identitat 21770721W, i estudiant del Grau en Física de la Universitat Autònoma de Barcelona, en relació amb la memòria del treball de final de Grau presentada per a la seva defensa i avaluació durant la convocatòria de Juliol del curs 2022-2023, declaro que

- El document presentat es original i ha estat realitzat per la meva persona.
- El treball s'ha dut a terme principalment amb l'objectiu d'avaluar l'assignatura de treball de grau en física en la UAB, i no s'ha presentat prèviament per a ser qualificat en l'avaluació de cap altra assignatura d'aquesta universitat ni de cap altra.
- En el cas de continguts de treballs publicats per terceres persones, l'autoria està clarament atribuïda, citant les fonts degudament.
- En el casos en els que el meu treball s'hagi realitzat en col·laboració amb altres investigadors i/o estudiants, es declara amb exactitud quines contribucions es deriven del treball de tercers i quines es deriven de la meva contribució.
- A l'excepció del punts esmentats anteriorment, el treball presentat és de la meva autoria.

Signat:

A.4.2 Declaració d'Extensió del Treball de Grau

Jo, Maximilià Soler Subirana, amb Document Nacional d'Identitat 21770721W, i estudiant del Grau en Física de la Universitat Autònoma de Barcelona, en relació amb la memòria del treball de final de Grau presentada per a la seva defensa i avaluació durant la convocatòria de Juliol del curs 2022-2023, declaro que:

- El nombre total de paraules (segons el comptatge proposat) incloses en les seccions des de la introducció fins a les conclusions és de X paraules.
- El nombre total de figures es de X .
- En total el document, comptabilitza: paraules + x 200 paraules/figura =
Que compleix amb la normativa en ser inferior a 10000.

Signat:

A.4.3 Declaració Supervisió Treball de Grau

Aquest document té com a objectiu certificar que l'alumne Maximilià Soler Subirana, amb DNI 21770721W, ha realitzat el seu treball titulat X sota la meua direcció, i el presentarà per tal de defensar l'assignatura al Treball final de grau en el Grau de física. L'alumne m'ha fet arribar el formulari word d'avaluació de l'activitat de l'alumne per part del director. (Si us plau, feu-lo arribar omplert a tfg.física@uab.cat abans del lliurament de les memòries)

List of Figures

1	(a)Estructura general del model 5EKI, que presenta sis cadenes similars a causa del mètode d'obtenció de cristal·lografia de rajos X. (b) Cadena E del model acabat de mencionar, que considerem el model més bo (veure Annex). (c) Terminal C d'aquest model, lloc crucial per a la interacció amb la proteïna CCR7.	6
2	(a) Aspecte general del potencial superficial de la proteïna a T ambient. (b) Aspecte a T del cos (36,5°C). (c) Aspecte a T ambient, rotat 180° a l'eix y. (d) Aspecte a T corporal, rotat 180° a l'eix y.	7
3	Estructura general del model 2L4N	9
4	Terminal C del model 24LN (59 a final)	9
5	Residus 9-11, 16, 19, 21, 36, 47-50, 52 i 53 del model 2L4N	10
6	Estructura general del model 5EKI	10
7	Cadena E del model 5EKI	11
8	Terminal C (70-79) de la cadena E (5EKI)	11

List of Tables