

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

UAB
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	Hipòtesis i objectiu final	4
2	Mètode	5
2.1	Equació de Poisson-Boltzmann	5
2.2	Càrrega de les proteïnes	6
3	Resultats	7
3.1	Sel·lecció del model proteic	7
3.2	Càlcul electrostàtic superficial de la proteïna	7
3.3	Heparina	9
4	Conclusions i comentari final	10
A	Apèndix	11
A.1	Bibliografia	11
A.2	Annexos	12
A.2.1	Estudi i sel·lecció del millor model virtual	12
A.2.2	Obtenció dels arxius per l'APBS	15
A.3	Índex alfabètic	17
A.4	Declaracions	18
A.4.1	Declaració d'autoria del Treball de Fi de Grau	18
A.4.2	Declaració d'Extensió del Treball de Grau	19
A.4.3	Declaració Supervisió Treball de Grau	20

1 Introducció i objectius

1.1 Motius

En el present treball s'estudia la interacció, suposadament electroestàtica, entre dues molècules, la proteïna CCL21 i un hidrogel compost principalment d'heparina, per a la millora d'una de les noves teràpies contra el càncer, la immunoteràpia.

Aquesta consisteix, a gran escala, en millorar l'efectivitat de les cèl·lules T del mateix pacient que pateix un càncer i les defenses del qual no poden lluitar adequadament contra el tumor. Per a poder millorar la condició d'aquestes cèl·lules, és necessari extreure-les i tractar-les al laboratori. Això implica haver de trobar un entorn apte per a les cèl·lules T, que ha de ser similar al de l'interior del cos humà.

Per al correcte desenvolupament d'aquestes, necessitarem descobrir i estudiar les principals interaccions entre les seves membranes, que és per on poden unir-se i interactuar amb el medi, i els diferents teixits del cos humà. Aquí és on indaga aquest treball: l'estudi de la interacció electroestàtica d'una proteïna de la membrana cel·lular altament electropositiva amb un entorn similar al d'un gangli limfàtic, altament electronegatiu.

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 es vol 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].

1.3 Electroestàtica

Dins les cèl·lules hi ha 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. Això és a causa de l'agitació tèrmica: al món microscòpic, tots els elements estan en moviment a causa de la temperatura. 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 ions ara confronten una dicotomia: si s'allunyen generen entropia, però per a dispersar-se necessiten energia ja que provenen d'una molècula que han deixat carregada. El resultat final, és doncs, que generen la màxima entropia que els és possible amb la mínima energia. Dins els medis cel·lulars que es volen 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 [2].

Considerant el solvent tant a temperatura ambient (293.15K) com corporal (309.65K), el sistema presenta certa energia tèrmica. Ara prenem en compte $k_B T^\circ$, que és l'energia termal per element: quan tenim una energia igual o superior a aquesta, les vibracions s'elevan i permeten la separació d'un element respecte la molècula principal. En altres paraules, si tenim $E_t \geq k_B T^\circ$, diem que tenim un sistema ionitzable.

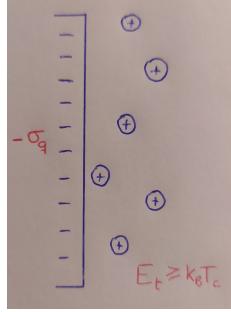


Figure 1: Superfície carregada amb densitat $-\sigma_q$, en solvent, rodejada pel seu núvol iònic, de signe contrari.

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. Es diu doncs que es tracten d'estructures estereoespecífiques. Per a solucionar aquest problema, és a dir, determinar el potencial a la superfície d'aquests macroions, es fa servir l'equació de Poisson-Boltzmann, explicada més endavant a la secció de Mètodes.

1.4 Hipòtesis i objectiu final

Finalment doncs, aquest treball rau en la creació d'un àmbit quasi-perfecte per a aquestes cèl·lules i la seva reproducció. És necessari 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 cas del present treball, es fa servir un hidrogel creat principalment amb heparina i un químic anomenat polietilenglicol per a simular aquest entorn del gangli linfàtic. 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 electroestàtica amb l/heparina, que serà un dels principals punts d'aquest estudi.

La hipòtesi que es planteja és, doncs, comprovar si la interacció entre la proteïna CCL21 i l/heparina és purament elecetroestàtica, o si n'hi ha d'altres rellevants. En cas afirmatiu, caldrà comprovar, a més, quins *binding sites* utilitzen cadascuna i la geometria assolida. Finalment, serà necessari validar o refusar si es tracta d'una interacció suficientment efectiva per a l'estudi en immunoteràpia.

S'investigaran 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.

En resum, els objectius punt per punt seran:

- Determinar la millor estructura digital de la molècula CCL21.
- Estudiar-la.
- Trobar-ne el potencial electroestàtic a la superfície.
- Realitzar els mateixos passos per a una estructura fiable de l/heparina.
- Comprovar la interacció i geometria assolida (el punt i orientació més probables d'unió) d'aquestes dues molècules.
- Verificar si es tracta d'una interacció purament electroestàtica o hi intervenen d'altres.
- Determinar finalment si es prou bona per a l'estudi en immunoteràpia.

2 Mètode

2.1 Equació de Poisson-Boltzmann

El mètode de Poisson-Boltzmann permet determinar la càrrega de potencial a la superfície desitjada, amb els paràmetres que hom decideix. Partint de l'esquema mencionat anteriorment [?] amb una densitat de càrrega superficial uniforme ($-\sigma_q$), s'estudia el seu comportament en un solvent amb densitat de càrrega $\rho_q(x)$. Suposant que es tracta d'un camp elèctric uniforme en direcció a l'eix x, es té que el camp és:

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

On ε representa la permetivitat del medi. D'aquí es pot deduir, a partir de la llei de Gauss:

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

Que serveix per a càregues superficials de volums. Amb això determinat, es comença a idear com trobar la càrrega superficial del macroió estudiat: es pot veure que és necessari saber la càrrega dels contraions i el macroió, que aquesta depèn, alhora, de la posició i càregues de la resta. Decidim doncs establir una mitjana aproximada de la densitat de càrrega volumètrica, $\langle \rho_q \rangle$. El potencial que aquesta crea s'anomena camp mitjà (mean field), i l'escribim com a $V(x)$.

La justificació d'aquesta aproximació és, que per a un ió rodejat de molts altres, hi haurà tantes interaccions que la fluctuació de $V(x)$ relativa serà més aviat mínima.

Es vol conèixer doncs la concentració de contraions, i.e. $c_+(x)$. Per a obtenir-la, convé fer l'aproximació en aigua pura, en altres paraules, la concentració lluny de la superfície tendeix a la nul·litat. Per altra banda, el potencial electroestàtic de qualsevol contraió és $xV(x)$, ja que s'ha considerat un camp constant a x. Suposant que cada ió es mou de manera independent en un potencial fix, es pot veure que es tracta d'una distribució de Boltzmann, que podem escriure tal que $c_+(x) = c_0 e^{-eV(x)/k_B T}$, amb c_0 constant, i suposant que $q = +e$.

Recordant que $\mathcal{E} = -dV/dx$, s'arriba a l'equació de Poisson $\frac{d^2V}{dx^2} = -\rho_q/\varepsilon$.

Aquí entra en dubte la unió d'aquestes dues equacions. Per una banda, tenim les càregues fixes a la superfície, que vénen determinades per la relació de Poisson. Per altra però, tenim les lliures que són determinades a partir de la distribució de Boltzmann. És ràpid de veure que, tant una com l'altra, s'affecten mútuament: el canvi de potencial modifica la concentració d'ions, i el canvi de l'última en modifica el primer. Per tant, s'han de determinar a la vegada, fet que acostuma a ser complex ja que no existeix una solució analítica en ser no-lineal. Hom podria pensar de fer una aproximació lineal, però aquesta només seria vàlida per a un potencial inferior a $k_B T$, que com bé s'ha mencionat prèviament, no succeeix en l'àmbit d'estudi.

Per a deduir la relació entre aquestes dues equacions, cal establir prèviament alguns paràmetres. A més, és necessari veure que ρ_q es pot expressar com la càrrega de l'electró multiplicada per la concentració que es vol determinar, i.e. $\rho_q = ec_+(x)$.

A partir d'aquí es veu que:

$$\frac{d^2V}{dx^2} = -\frac{ec_+(x)}{\varepsilon} \quad (3)$$

Aquesta equació pot millorar-se per a entendre'n millor el comportament. Un canvi de terme interessant és el del potencial adimensional reescalat, que permet comparar la relació directa, l'ordre de magnitud, entre l'energia tèrmica de les molècules a temperatura ambient, $k_B T$ amb el potencial de la superfície en el medi. Dit altrament, representa el potencial electroestàtic que ve alliberat a causa de l'agitació tèrmica a certa temperatura, com l'ambient, o en aquest cas, la corporal. Es pot reescriure com:

$$\bar{V} = \frac{eV(x)}{k_B T} \quad (4)$$

Això modifica l'equació anterior tal que:

$$\frac{d^2\bar{V}}{dx^2} = -\frac{e^2 c_0 e^{-\bar{V}}}{\varepsilon k_B T} \quad (5)$$

On hem reescrit $c_+(x)$ com $c_0e^{-\bar{V}}$.

Aquest raonament fa que Niels Bjerrum (1879-1958) trobi una altra magnitud d'ampli interès d'estudi: la longitud de Bjerrum. Aquesta indica a partir de quina distància la interacció electroestàtica entre dues partícules comença a ser comparable a kT , o en altres paraules, quant podem acostar dues molècules de càrrega de mateix signe sense que es repel·leixin. En aigua a temperatura ambient amb ions monovalents, es dóna a 0.71nm. La fórmula que va trobar és:

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon k_B T} \quad (6)$$

Que introduïda a l'equació anterior, acaba proporcionant la coneguda equació de Poisson-Boltzmann:

$$\frac{d^2\bar{V}}{dx^2} = -4\pi l_B c_0 e^{-\bar{V}} \quad (7)$$

Utilitzada per a la superfície que interessa analitzar [3]. Aquesta equació, com que acostuma a ser no-linial i per tant irresoluble manualment, es calcula de forma numèrica amb l'aplicació APBS (Automatic Poisson-Boltzmann Solver) al VMD, programa que és utilitzat en aquest treball per a estudiar les estructures en detall. El procés seguit és descrit amb més detall a l'annex.

2.2 Càrrega de les proteïnes

El nombre d'aminoàcids acídics i bàsics determina la càrrega d'una proteïna. Ja sigui a la pròpia proteïna o al medi, aquests interactuen entre ells deixant carregada positiva o negativament la molècula estudiada. Això condueix a pensar en el comportament les càrregues móbils de la superfície mencionada anteriorment i els ions presents a la dissolució: hi ha càrregues positives i negatives, sobretot en medis aquosos com és el cos humà. Per tant, és necessari reescriure l'equació de Poisson-Boltzmann per a diferents tipus de càrregues.

Aquest cop però, en comptes de partir de les condicions inicials per a la concentració d'ions, com que n'hi ha més d'una, per a positius i negatius; el millor serà establir aquestes condicions al potencial del medi $V(x)$, que el farem tendir a zero a l'infinít. Això duu a: $c_+(x) = c_\infty e^{-eV(x)/k_B T}$ i $c_-(x) = c_\infty e^{-(e)V(x)/k_B T}$.

Es pot veure que per a l'aigua, les concentracions a l'infinít segueixen sent les mateixes, ja que els ions hi són sempre presents. Lluny del lloc a estudiar però, podem considerar que les concentracions són iguals per a positius i negatius, és a dir:

$$\frac{d^2\bar{V}}{dx^2} = -\frac{1}{2}8\pi l_B c_\infty \left(e^{-\bar{V}} - e^{\bar{V}} \right) \quad (8)$$

Peter Debye (1884-1966), de manera similar a Bjerrum, descobreix una magnitud interessant en aquesta expressió: la longitud de Debye, que en aquests casos es representa com $\lambda_D = (8\pi l_B c_\infty)^{-1/2}$. Aquesta magnitud ens indica fins a on persisteixen els efectes electroestàtics d'una solució. En altres paraules, a distàncies més grans que la longitud de Debye, els camps elèctrics comencen a patir un efecte d'apantallament que decau de forma exponencial. Per a l'aigua a temperatura ambient, és aproximadament 0.7nm, suposant 100mM per a cada ió.

Aquesta longitud pot ser implementada dins l'equació de Poisson-Boltzmann com:

$$\frac{d^2\bar{V}}{dx^2} = -\frac{1}{2}\lambda_D^{-2} \left(e^{-\bar{V}} - e^{\bar{V}} \right) \quad (9)$$

Finalment cal remarcar doncs, que s'utilitza el programari APBS [12] per a la resolució numèrica ja que l'analítica en aquest cas és impossible en ser no-lineal.

3 Resultats

3.1 Sel·lecció del model proteic

La proteïna desitjada per a l'estudi és la CCL21. Al *Protein Databank*, lloc on s'emmagatzem les estructures moleculars de forma digital, s'hi troben dos models: 2L4N i 5EKI. Aquestes estructures de proteïnes han estat obtingudes de forma experimental, detallades als annexos. En comparar les estructures, es determina que l'estructura més adient per a aquest estudi és la 5EKI, més concretament la cadena E (ja que el model al PDB presenta sis cadenes similars de la mateixa proteïna). Aquesta sel·lecció és a causa de la important presència d'uns aminoàcids a la terminal C (a partir del 70) de l'estructura 5EKI per a la interacció amb altres proteïnes com la CCR7, que no són presents a la 2L4N. El protocol seguit a la comparació s'explica en detall als annexos.

Cal remarcar però, que cap de les dues estructures es considera completa. La cadena E de la 5EKI manca els 5 primers aminoàcids, però no s'han considerat crucials per a aquest estudi. L'aparença d'aquesta molècula és la següent:

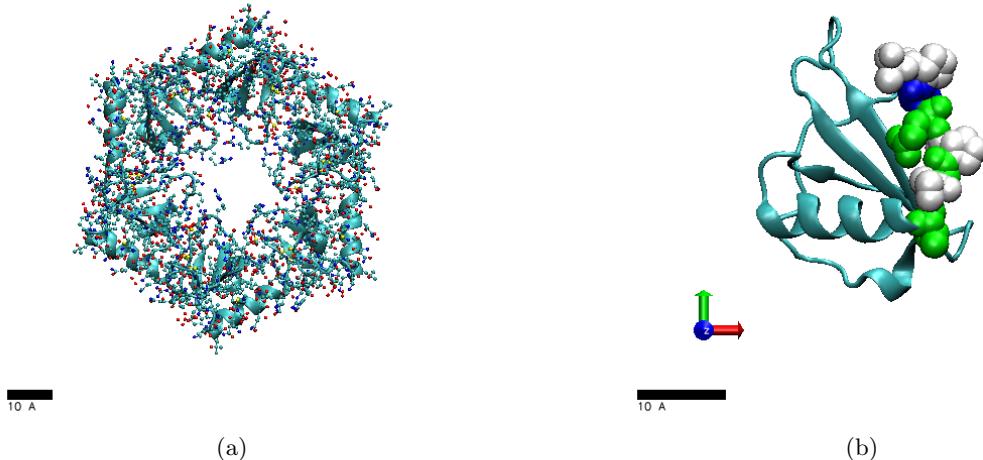


Figure 2: (a) Estructura de codi 5EKI, que presenta sis cadenes similars a causa del mètode d'obtenció de cristal·lografia de rajos X. Presenta 3639 àtoms, sense hidrògens. (b) Cadena E de l'estructura acabada de mencionar, que es considera el més bo (veure Annex) amb la terminal C d'aquest model, lloc crucial per a la interacció amb la proteïna CCR7. Presenta 583 àtoms, sense hidrògens. Els gràfics utilitzats per a l'estructura base són NewCartoon. A la primera fotografia utilitzem CPK per a veure els residus més clarament, i a la segona indiquem la terminal amb VDW colorats segons el tipus de residu.

Es calcula, a més, la càrrega total de la cadena E, que proporciona un resultat de 7e. Per a la interpretació dels arxius pdb, es poden consultar els annexos.

3.2 Càlcul electrostàtic superficial de la proteïna

Mitjançant l'APBS es resolen les equacions de Poisson-Boltzmann mencionades a la secció anterior. És interessant recalcar les condicions prèvies establertes. Establint unes concentracions de 100mM NaCl. 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, es troben les següents figures:

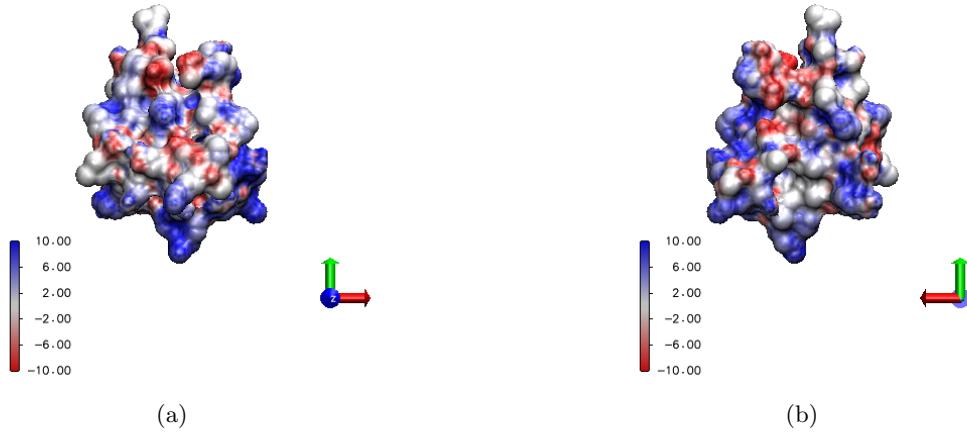


Figure 3: (a) Aspecte a T del cos ($36,5^{\circ}\text{C}$). (b) Aspecte a T corporal, rotat 180° a l'eix y.

Cal recalcar que s'ha obtingut aquesta imatge fent servir un rang de potencials de -10 a +10: representa el potencial adimensional, que a temperatura del cos humà representa una $k_B T$ d'uns 4.28fJ (femtojoules), segons els valors trobats amb més freqüència a l'arxiu dx. Com que les figures obtingudes amb la temperatura ambient són molt similars a les del cos, s'han mostrat a l'annex.

Es pot veure que la zona blava, sobretot a la imatge a 180º, correspon aproximadament a la terminal que interessa estudiar, vista abans. Es pot deduir que es tracta d'una estructura molt inhomogènia, que de fet en part pot semblar útil a l'hora d'addherir-se a l/heparina, de càrrega negativa, ja que les zones positives que veiem al gràfic són relativament lluny de les negatives, que afavoreix la unió sense repel·lir-se.

3.3 Heparina

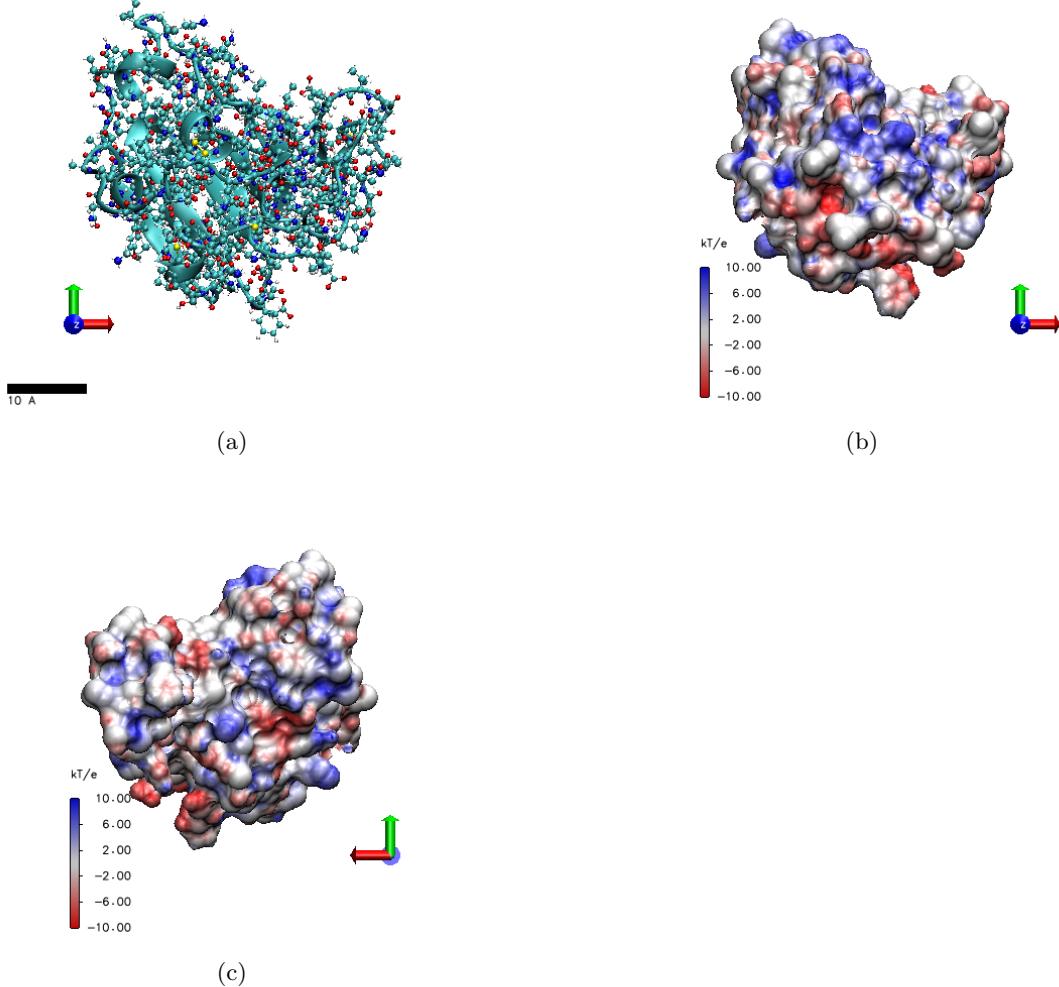


Figure 4: (a) Estructura general de l/heparina [14], amb 2835 àtoms, hidrògens inclosos, T ambient (298.15K). (b) Aspecte a T ambient pel potencial a la superfície. (c) Mateix que b), a 180° rotat en y. El color blau representa la tendència cap a càrregues positives i, el vermell, negatives.

A la primera imatge s'observa l'estructura general de l/heparina amb escala [14]. A la segona, es pot observar el comportament del potencial a la superfície mitjançant l/APBS. Tot i ser també molt inhomogènia la distribució de càrregues oposades com passa amb la CCL21, a (b) es pot veure, a la zona inferior, un vermell intens que podria ser un punt interessant d'unió entre les dues. En una primera aproximació geomètrica, a més, es pot divisar que aquesta zona pot encaixar amb facilitat amb l/apèndix inferior vist a [?], altament electropositiva. La zona corresponent a la cua vista a [?] no sembla, de moment, destacar electroestàticament en aquest procés, ja que no presenta càrregues molt intenses. Això però es podrà acabar de confirmar-ho un cop realitzats els càlculs pertinents amb el programa adient.

El que pertoca és doncs calcular, de forma analítica i aproximada, la interacció entre aquestes dues molècules. Segurament apareixerà un resultat força diferent al numèric, però almenys s'ha d'intentar que quadri amb l'ordre de magnitud.

4 Conclusions i comentari final

A Apèndix

A.1 Bibliografia

- [1] <https://www.youtube.com/watch?v=eckgmqiBBRo> “Avancem en la immunoteràpia contra el càncer amb materials 3D amb Ignacio Crespo” per ICMAB-CSIC
- [2] Nelson, P., “Biological Physics: Energy, Information, Life,” *Entropic forces at work*, pp. 230-231, First Edition (2003).
- [3] Nelson, P., “Biological Physics: Energy, Information, Life,” *Entropic forces at work*, pp. 232-235, First Edition (2003).
- [4] <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> Pàgina principal del programari VMD.
- [5] <https://www.rcsb.org/structure/2l4n> Primer model considerat, 2L4N.
- [6] https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/l4/2l4n/2l4n_full_validation.pdf Informe sobre l’obtenció del model mencionat i els procediments aplicats.
- [7] <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi201601k> Document informatiu sobre el model 2L4N de la proteïna CCL21.
- [8] <https://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/vmd/tutorial-html/> Tutorial utilitzat en aquest treball.
- [9] <https://www.rcsb.org/structure/5EKI> Segon model utilitzat.
- [10] <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.6b00304> Document informatiu del model 5EKI.
- [11] https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/ek/5eki/5eki_full_validation.pdf Informe d’obtenció del model 5EKI. pp. 4, 9-10.
- [12] <https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr> Convertidor en línia d’arxius PDB/PSF a PQR i APBS.
- [13] <https://github.com/MaxTFG/TFG> Arxius treballats per a consultar.
- [14] <https://amarolab.ucsd.edu/covid19.php> Arxius generats per a l’estudi de l’heparina.

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 sel·leccionat per a estudiar és l'anomenat 2L4N, de la proteïna CCL21 com s'ha esmentat abans [4] [5]. Per a saber fer anar el programa, la pàgina conté alguns tutorials essencials. Els utilitzats en aquest treball han estat els mencionats a la bibliografia [8].

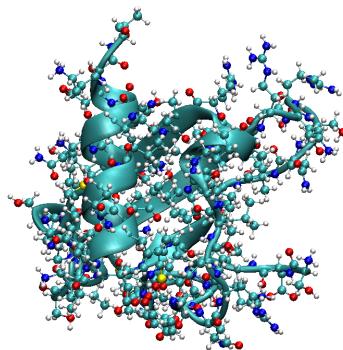


Figure 5: Estructura general del model 2L4N

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 [6].

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.

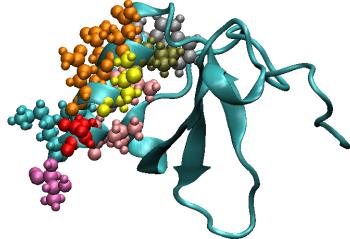


Figure 6: Terminal C del model 24LN (59 a final)

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 [7]. En són els següents:

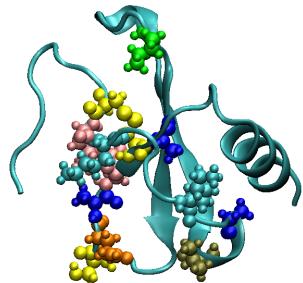


Figure 7: Residus 9-11, 16, 19, 21, 36, 47-50, 52 i 53 del model 2L4N

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 ríos X [9].

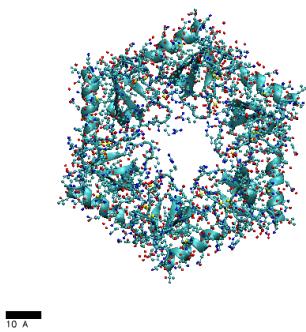


Figure 8: Estructura general del model 5EKI

Trobem 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 [10] [11] (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.

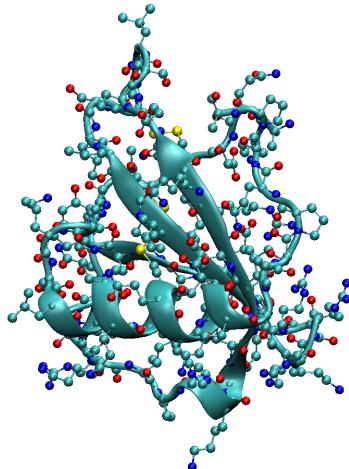


Figure 9: Cadena E del model 5EKI

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 càculs que ens interessen realitzar.

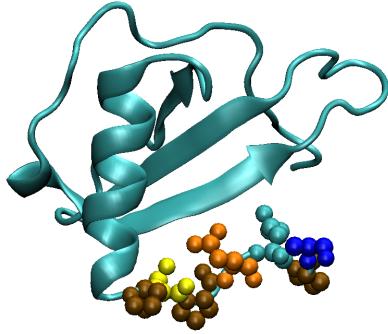


Figure 10: Terminal C (70-79) de la cadena E (5EKI)

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. Veiem que l'única discrepància es troba als primers aminoàcids com mencionat anteriorment.

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. Podem utilitzar els convertidors en línia mencionats a la bibliografia [12], que afegeixen pel seu compte els hidrògens i altres àtoms que falten a la proteïna.

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 part, convindria calcular la càrrega total de la proteïna, que ho podem fer sumant la segona columna de l'arxiu PQR amb Excel o similar. Necessitarem aquest resultat per a establir quins límits, en termes de kT/e , desitgem al gràfic del potencial de superfície.

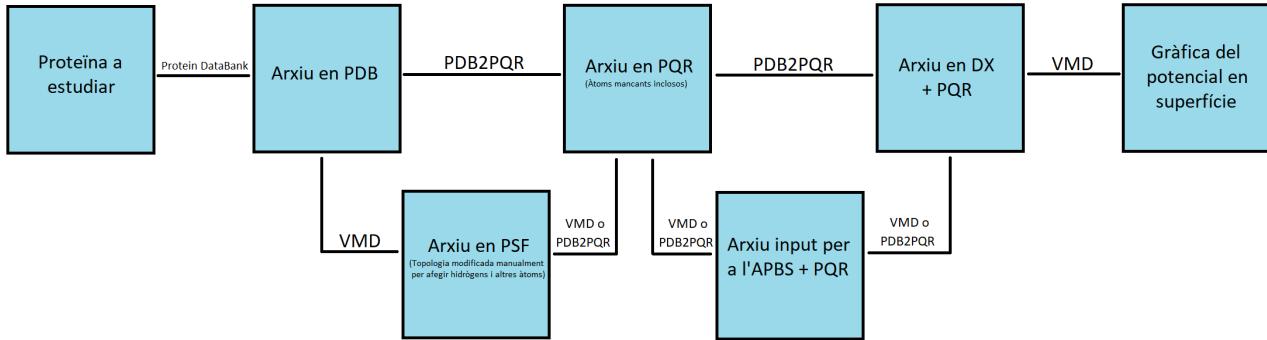


Figure 11: Procés seguit a la primera part.

La disposició dels arxius PQR és la següent: la primera columna especifica el tipus d'element (ATOM / HETATM), el segon l'ordre, el tercer la posició dins l'aminoàcid, i el quart l'aminoàcid al qual pertany.

La cinquena columna menciona el chainID, a quina cadena pertany l'àtom. Les tres següents especificuen les posicions X Y Z, i la següent és la càrrega, que en sumar tota la columna obtenim la càrrega total de la proteïna. Finalment l'última columna és el radi de cada àtom. Per a consultar els arxius utilitzats, es pot veure el GitHub a [13].

Els resultats per a la temperatura ambient del potencial a la superfície són:

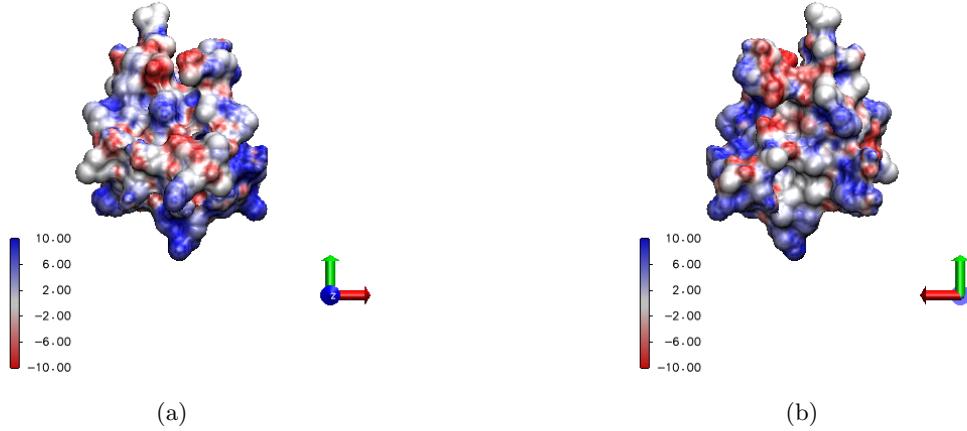


Figure 12: (a) Aspecte general del potencial superficial de la proteïna a T ambient. (b) Aspecte a T ambient, rotat 180° a l'eix y.

Pel que fa a l/heparina, repetim el mateix procés esmentat abans amb els arxius trobats a [14] dins la carpeta ”*spike_apbs_amarolab.tar.gz*”, amb l/arxiu ”complex.pqr” trobat a ”pqrs” dins *rbshep* i ”complex.in” trobat a ”ins”. Tot això al convertidor en línia ens proporciona les imatges mencionades en l’apartat de l/heparina.

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 els 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 dels 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 meva 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	Superfície carregada amb densitat $-\sigma_q$, en solvent, rodejada pel seu núvol iònic, de signe contrari.	4
2	(a)Estructura de codi 5EKI, que presenta sis cadenes similars a causa del mètode d'obtenció de cristal·lografia de rajos X. Presenta 3639 àtoms, sense hidrògens. (b) Cadena E de l'estructura acabada de mencionar, que es considera el més bo (veure Annex) amb la terminal C d'aquest model, lloc crucial per a la interacció amb la proteïna CCR7. Presenta 583 àtoms, sense hidrògens. Els gràfics utilitzats per a l'estructura base són NewCartoon. A la primera fotografia utilitzem CPK per a veure els residus més clarament, i a la segona indiquem la terminal amb VDW colorats segons el tipus de residu.	7
3	(a) Aspecte a T del cos (36,5°C). (b) Aspecte a T corporal, rotat 180º a l'eix y.	8
4	(a) Estructura general de l/heparina [14], amb 2835 àtoms, hidrògens inclosos, T ambient (298.15K). (b) Aspecte a T ambient pel potencial a la superfície. (c) Mateix que b), a 180º rotat en y. El color blau representa la tendència cap a càrregues positives i, el vermell, negatives.	9
5	Estructura general del model 2L4N	12
6	Terminal C del model 24LN (59 a final)	13
7	Residus 9-11, 16, 19, 21, 36, 47-50, 52 i 53 del model 2L4N	13
8	Estructura general del model 5EKI	14
9	Cadena E del model 5EKI	14
10	Terminal C (70-79) de la cadena E (5EKI)	15
11	Procés seguit a la primera part.	15
12	(a) Aspecte general del potencial superficial de la proteïna a T ambient. (b) Aspecte a T ambient, rotat 180º a l'eix y.	16

List of Tables