



# Péptidos derivados del GB virus C como potenciales inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

Ramona Galatola

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

# **Péptidos derivados del GB virus C como potenciales inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1**



Ramona Galatola.

Barcelona, 2014

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **1 PÉPTIDOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE LA GLICOPROTEÍNA E2 DEL GBV-C COMO POSIBLES INHIBIDORES DEL HIV-1**

En los últimos años, se ha demostrado que la glicoproteína de envoltura E2 del virus GBV-C inhibe la infección causada por el virus del HIV-1. Concretamente, varios estudios recientes han descrito que esta proteína inhibe la entrada del virus HIV-1 en las células y que ciertos dominios peptídicos derivados de la misma intervienen en la unión y/o fusión del virus a las células [64, 65, 68, 69, 101-103].

En nuestro grupo de investigación, la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédica de Péptidos (USIBAP), se han obtenido péptidos derivados de la proteína E2 con la finalidad de identificar dominios peptídicos con capacidad de inhibir el proceso de entrada del virus HIV-1 en las células [69]. Así, se llevó a cabo la síntesis en fase sólida de 124 secuencias peptídicas compuestas por 18 aminoácidos, solapadas en 15 residuos, que cubrían la totalidad de la estructura primaria de la proteína.

En colaboración con el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico de Barcelona, se analizó la capacidad de estas secuencias peptídicas de inhibir la replicación del virus del HIV-1 en cultivos celulares. Los resultados obtenidos demostraron que algunos de los dominios peptídicos de la proteína E2 interferían en la infección por el HIV-1, disminuyendo la replicación *in vitro* del virus de manera dosis-dependiente [69].

Paralelamente, se realizaron ensayos celulares que mimetizaban la entrada del virus del HIV-1 en las células. Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron células HeLa que expresaban la proteína de la envoltura del HIV-1 y células TZM-bl que expresaban los receptores y correceptores de membrana de los linfocitos (CD4, CCR5 y CXCR4). Los resultados obtenidos demostraron que ciertas secuencias peptídicas de la proteína E2, disminuían notablemente la fusión de estas células, indicando como un probable mecanismo de actuación la inhibición de la entrada del virus en las células [69].

El proceso de fusión entre las membranas vírica y celular, que conlleva la entrada del virus en las células, está mediado por el extremo amino terminal de la glicoproteína gp41 (región 1-23, AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAAS) dominio conocido como péptido de fusión (PF-HIV-1). Esta es una región rica en residuos de glicina y alanina, aminoácidos que le confieren una mayor plasticidad y que, dada su hidrofobicidad, contribuyen en su interacción con las membranas biológicas [117, 183].

Con la finalidad de tratar de entender los mecanismos de interacción del PF-HIV-1 en la penetración celular, se han realizado numerosos estudios con péptidos sintéticos. Estos estudios se llevan a cabo mediante diferentes métodos biofísicos y bioquímicos [184] y emplean membranas celulares [127] o bien modelos de membrana [128], como son los liposomas o las monocapas lipídicas. Así, por ejemplo, mediante el ensayo biofísico de liberación del contenido vesicular (*leakage*), realizado con liposomas que tienen sondas fluorescentes encapsuladas en su espacio interior, se ha demostrado que el PF-HIV-1 permeabiliza membranas lipídicas con carga negativa provocando la salida de las sondas en el medio acuoso [167]. Se ha demostrado que, en presencia de algunas secuencias peptídicas de la glicoproteína E2, el proceso de permeabilización inducido por el PF-HIV-1 disminuye, indicando de este modo la inhibición de la actividad del PF-HIV-1 [69].

Paralelamente a este ensayo, para cuantificar la unión entre los péptidos de la proteína E2 y el PF-HIV-1 se utilizó la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR). Mediante la inyección de concentraciones crecientes de los péptidos de la proteína E2 sobre un chip sensor con el PF-HIV-1 inmovilizado, se determinaron las constantes de afinidad entre los péptidos y el PF-HIV-1, las cuales representan una medida directa de la unión entre las dos moléculas. Los resultados mostraron una evidente interacción entre algunas secuencias peptídicas E2 y el PF-HIV-1 [69]. La afinidad entre los péptidos E2 y el PF-HIV-1 fue confirmada mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), la cual permite determinar los parámetros termodinámicos asociados a la unión del PF-HIV-1 con

los péptidos E2. Se inyectaron concentraciones crecientes de péptidos sobre una disolución de PF-HIV-1 y se determinó la cantidad de calor liberado o absorbido durante la interacción entre las moléculas. Los valores obtenidos de afinidad de unión concordaron perfectamente con los valores de los parámetros cinéticos calculados mediante la técnica SPR, confirmando así la unión entre ciertas secuencias peptídicas de la proteína E2 del GBV-C y el PF-HIV-1.

El ensayo del *leakage* demostró que algunas secuencias de la proteína E2 inhibían la capacidad del PF-HIV-1 de desestabilizar membranas lipídicas, entre ellas las que mostraron una destacable inhibición fueron las secuencias peptídicas E2(175-192), E2(289-306) y E2(313-330) (respectivamente, P59, P97 y P105) (Tabla 7), lo que las convirtió en candidatas a posibles inhibidores de la entrada del virus HIV-1 a la célula. Las técnicas de SPR e ITC cuantificaron la interacción del PF-HIV-1 con estos péptidos, mostrando una evidente interacción de P97 y P105 con el PF-HIV-1, mientras que para P59 no se pudo cuantificar la unión con ninguna de estas técnicas.

Para profundizar en el estudio de la interacción entre el PF-HIV-1 y las secuencias peptídicas P59, P97 y P105 de la proteína E2, se llevó a cabo el ensayo biofísico de las isotermas de unión.

**Tabla 7:** Estructura primaria de las secuencias peptídicas de la proteína E2 del virus GVB-C que interaccionan con el PF-HIV-1.

<b>Péptido GBV-C</b>	<b>Secuencia</b>
E2P59	RFPFHRCGAGPKLTKDLE
E2P97	LVRRRSELMGRRNPVCPG
E2P105	GRPDGFIHVQGHLLQEVD

### **1.1 Estudio de interacción entre los péptidos P59, P97 y P105 de la proteína de envoltura E2 del GBV-C y el PF-HIV-1 mediante las isoterms de unión**

Con el fin de estudiar la interacción de los péptidos P59, P97 y P105 de la proteína E2 del GBV-C con el PF-HIV-1 se realizó un ensayo de fluorescencia utilizando liposomas como modelo de membrana.

Los modelos de membrana representan una buena aproximación para estudiar procesos biológicos que ocurren a nivel de la membrana, como es la interacción virus-célula. A pesar de que estos modelos no son siempre representativos de los acontecimientos que ocurren en la realidad biológica, se utilizan extensamente para obtener información del mecanismo de infección y proliferación de los virus (por ejemplo HIV-1, virus Ébola), de la actividad de péptidos antimicrobianos, de péptidos capaces de generar respuesta inmune (vacunas sintéticas), así como de la actividad de péptidos neurotransmisores [184-187].

Los modelos de membrana utilizan principalmente fosfolípidos, ya que son los lípidos más abundantes en las membranas y tienen capacidad para formar bicapas (liposomas) espontáneamente cuando son dispersados en agua.

Para el ensayo se utilizaron liposomas unilamelares (LUVs) de palmitoiloleoilfosfoglicerol (POPG), que es un lípido con carga negativa, ya que se ha demostrado que el PF-HIV-1 interacciona más con lípidos aniónicos que con los lípidos zwitteriónicos como es la fosfatidilcolina (PC) [167].

Las vesículas lipídicas de POPG se prepararon en tampón TRIS 5 mM, a pH 7,4, según el procedimiento descrito en materiales y métodos. Posteriormente a la extrusión de las vesículas, se obtuvieron liposomas de  $96,8 \pm 2,0$  nm de diámetro con una concentración de 7,86 mM.

A continuación, se realizó el ensayo mediante el cual se midió el coeficiente de repartición de la fracción molar (coeficiente de unión) del PF-HIV-1 a liposomas y se cuantificó la

unión del péptido a los liposomas. Este estudio se basa en la fluorescencia intrínseca de péptidos que contienen grupos cromóforos naturales, como es el grupo indol del residuo del triptófano (Trp), la cual cambia según el entorno en que se encuentra el grupo cromóforo.

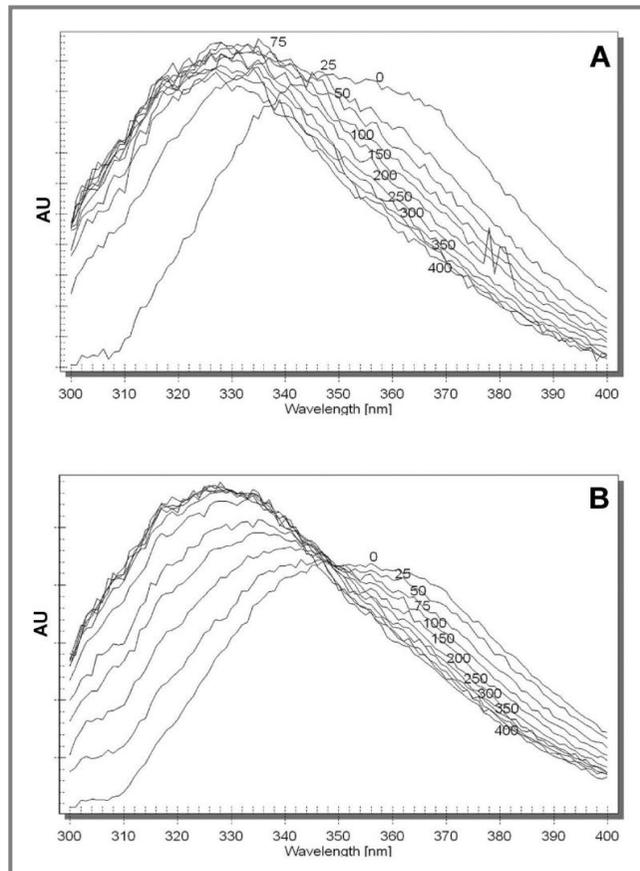
El Trp en solución acuosa presenta un espectro definido por la longitud de onda en un máximo del espectro de emisión ( $\lambda$ ) y por la intensidad de fluorescencia [188]. El estudio del péptido, en presencia de liposomas, aporta información acerca del cambio que se produce en el entorno del Trp. Así, que si el péptido interacciona con las vesículas fosfolípídicas, el Trp se encuentra en un ambiente más apolar. Este cambio se traduce en un desplazamiento del máximo de emisión, así como en un cambio en la intensidad de fluorescencia [189].

Para llevar a cabo el ensayo se utilizó un análogo del PF-HIV-1 con un residuo de Trp incorporado en su estructura primaria ( $W^8$  [1-23] gp41 HIV-1), lo que le proporciona propiedades fluorescentes. Cabe ser mencionado aquí que la sustitución del residuo de Phe (fenilalanina) por el Trp en la posición 8 no modifica sus propiedades fisicoquímicas ni su actividad fusogénica [184].

Se obtuvieron las isotermas de unión, tras registrar los cambios que se producían en la emisión de la fluorescencia intrínseca del péptido después de añadir concentraciones crecientes de liposomas. A partir de estas isotermas se determinó el coeficiente de repartición del péptido entre la solución y los liposomas, es decir, se obtuvo una medida de la unión establecida entre el PF-HIV-1 y las vesículas de POPG.

Como se muestra en la Figura 23, en presencia de liposomas de POPG (75  $\mu$ M), la emisión de la fluorescencia del Trp ( $\lambda_{\max}$ ) del PF-HIV-1 se desplaza drásticamente hacia 330 nm. Concretamente, se observa una disminución de más de 20 nm en la  $\lambda_{\max}$  debido a que el péptido se encuentra en un ambiente más hidrofóbico.

La preincubación de los péptidos derivados de la proteína E2 con el PF-HIV-1, a una relación equimolar, disminuyó en gran medida el desplazamiento de la emisión de la fluorescencia del Trp, lo que podría indicar una interacción entre los péptidos E2 y el PF-HIV-1 (Figura 23 y Anexo 1).



**Figura 23:** Espectros de fluorescencia de: A) PF-HIV-1 and B) PF-HIV-1/E2P97 (1/1) en presencia de concentraciones crecientes de liposomas de POPG (de 0 a 400  $\mu$ M).

Para calcular el coeficiente de unión del PF-HIV-1 a los liposomas se utilizó la intensidad de fluorescencia emitida por el Trp a 327 nm. Para cuantificar la interacción péptido/lípido fue necesario realizar una corrección de los valores de fluorescencia intrínseca, ya que al ir

incorporando la solución de liposomas no se tuvo en cuenta el error en la dilución. Cada valor se multiplicó por el cofactor de corrección obtenido a partir de los ensayos con el NATA (N-acetil-triptófanoamida) el cual no interacciona con los liposomas. En todas las medidas se restó la señal del blanco.

Una vez corregidos los datos experimentales, se ajustaron los valores de  $F/F_0$  a una ecuación hiperbólica (13):

$$\frac{F_{cp}}{F_{cp_0}} = \frac{1 + [L] \times [(F_{cp_{max}}/F_{cp_0}) - 1]}{k + [L]}$$

(13)

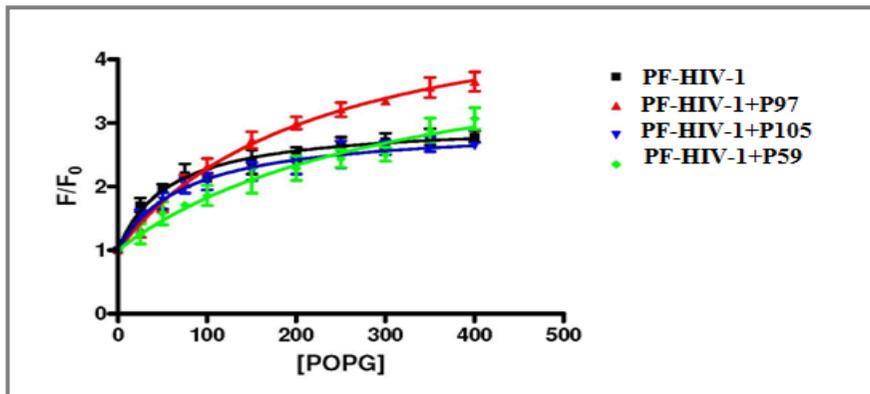
Donde:  $[L]$  es la concentración del lípido,  $F_{cp_0}$  es el valor de intensidad de fluorescencia inicial en ausencia de liposomas,  $F_{cp}$  es el valor de fluorescencia para cada concentración de liposomas y  $F_{cp_{max}}$  es la intensidad de fluorescencia máxima

De la ecuación anterior se calculó  $K$  (constante de unión aparente). Aplicando la ecuación (14), se calculó también  $K_x$  (constante de unión real).

$$K_x = \frac{W}{K}$$

(14)

Donde:  $W$  es la concentración molar del agua (55.3 M) y  $K$  es la constante de unión aparente (valor obtenido de la ecuación (13)).



**Figura 24:** Isotermas de unión obtenidas a partir de los cambios del máximo de fluorescencia del Trp en presencia de concentraciones crecientes de liposomas de POPG (0 a 400 μM).

En la Figura 24 se muestran las isotermas de unión del PF-HIV-1 en ausencia y en presencia de los péptidos P59, P97 y P105.

El PF-HIV-1 se une considerablemente a los liposomas ( $K_x = (9,7 \pm 1,7) \times 10^5$ ). Por otro lado, el coeficiente de repartición de la fracción molar del PF-HIV-1 en presencia de los péptidos derivados de la proteína E2 disminuye, siendo de  $1,7 \pm 0,4 \times 10^5$  para la mezcla PF-HIV-1/P59,  $2,5 \pm 0,6 \times 10^5$  para PF-HIV-1/P97 y  $7,5 \pm 0,8 \times 10^5$  para PF-HIV-1/P105. Los resultados muestran que el péptido P59 disminuye la unión del PF-HIV-1 a los liposomas de manera más eficiente que las regiones P97 y P105, siendo éste último el menos activo en este ensayo [69].

Las interacciones de los péptidos P59, P97 y P105 con el PF-HIV-1 tal y como se ha descrito anteriormente, se caracterizaron mediante otros ensayos biofísicos que, en buena medida, se correlacionaron con el ensayo de las isotermas de unión [69].

Se puede concluir que los resultados de los ensayos biofísicos demuestran la capacidad de estos tres péptidos de interactuar con el PF-HIV-1 y de inhibir su actividad, sugiriendo

que la inhibición de virus del HIV-1 inducida por la proteína E2 del virus GBV-C podría tener lugar a nivel de la entrada del virus a las células.

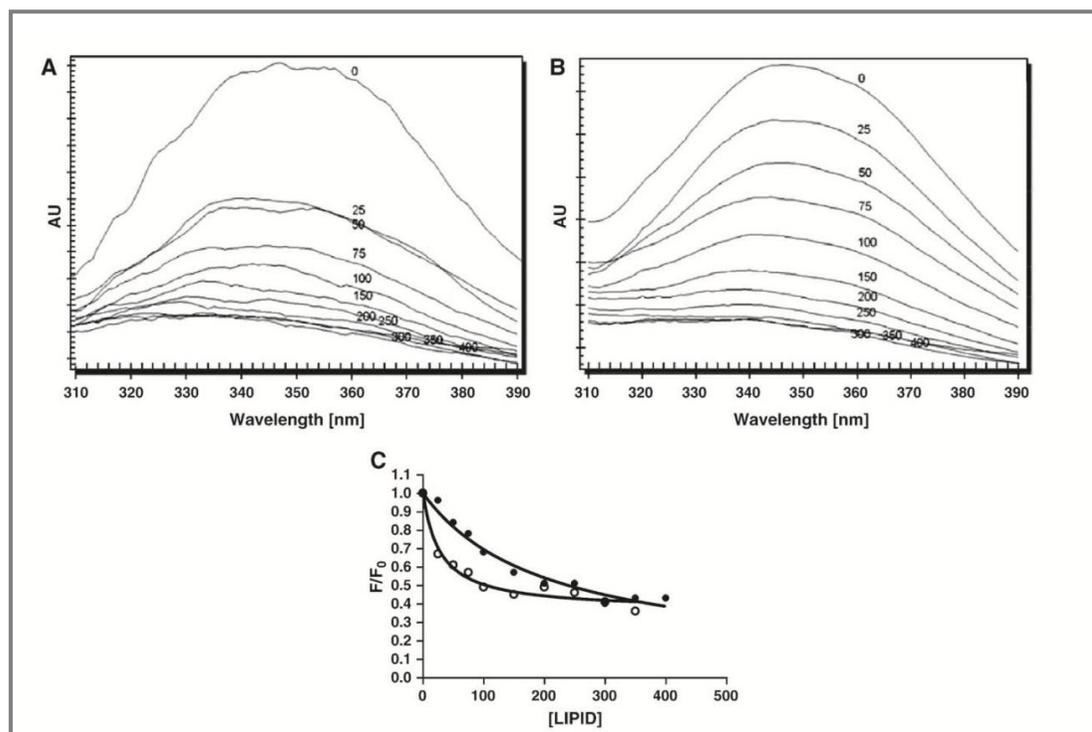
## **1.2 Estudio de interacción del péptido P59 de la proteína de envoltura E2 del GBV-C con PF-HIV-1 mediante el ensayo de las isotermas de unión**

Como se ha descrito en el precedente apartado, la secuencia peptídica P59 se ha seleccionado como el péptido que inhibe de forma más eficiente la unión del PF-HIV-1 a liposomas LUVs de POPG.

Con la finalidad de profundizar en la interacción que se establece entre el PF-HIV-1 y la secuencia peptídica P59, en el entorno de la membrana, se utilizaron liposomas formados por una mezcla lipídica fosfatidilcolina/fosfatidilserina (PC/PS, relación molar 3:2). Dado que la PC que tiene carácter zwitteriónico, constituye el mayor componente de la cara exterior de las membranas de las células no infectadas. Por otro lado, la PS que tiene carga negativa, se encuentra en elevada concentración en los linfocitos T infectados por el HIV-1 y los macrófagos [190]. Los liposomas de PC/PS se prepararon en tampón TRIS 10 mM, a pH 7,4, según el procedimiento que se ha descrito en materiales y métodos. Posteriormente a la extrusión de los liposomas, se obtuvieron vesículas de  $100 \pm 4,0$  nm de diámetro, a una concentración de 4,1 mM. El ensayo se llevó a cabo con el análogo fluorescente ( $W^8$  [1-23] gp41 HIV-1).

Se registraron los cambios que se producían, en el máximo de emisión de la fluorescencia del Trp, tras añadir concentraciones crecientes de liposomas. Como se muestra en la Figura 25 A, en presencia de liposomas de PS/PC el máximo de emisión de la fluorescencia del Trp ( $\lambda_{max}$ ) del PF-HIV-1 disminuyó, desplazándose unos 10 nm. Este desplazamiento de  $\lambda_{max}$  indica que el Trp se encuentra en un ambiente más hidrofóbico ya que es capaz de insertarse en las bicapas lipídicas de los liposomas. La preincubación del péptido derivado de la proteína E2 con el PF-HIV-1 evitó el desplazamiento de la emisión de la fluorescencia del Trp indicando así una interacción entre el péptido P59 y el PF-HIV-1, ya que la presencia de

P59 impide la inserción del Trp en la interfase hidrofóbica de la bicapa lipídica (Figura 25 B).



**Figura 25:** Espectros de emisión de fluorescencia de: A) PF-HIV-1, B) PF-HIV-1/P59 (1/5) en presencia de diferentes concentraciones de liposomas PC/PS (de 0 a 400  $\mu\text{M}$ ). C) : Isothermas de unión del PF-HIV-1 y PF-HIV-1/P59 obtenidas a partir de los cambios del máximo de fluorescencia del Trp en presencia de concentraciones crecientes de liposomas de PC/PS (0 a 400  $\mu\text{M}$ ).

A continuación se cuantificó la unión del PF-HIV-1 a las vesículas PS/PC mediante la medida de la intensidad de fluorescencia a  $\lambda_{\text{max}}$  346 nm. Tal y como se ha explicado con anterioridad, a todas las medidas se restó la señal del blanco y se corrigió el efecto de dilución multiplicando por el cofactor de corrección obtenido a partir de los ensayos con el NATA que no interacciona con los liposomas. Una vez corregidos los datos experimentales, se ajustaron los valores de  $F/F_0$  a la ecuación hiperbólica (13), obteniendo así isothermas de

unión. A partir de la misma se calculó la  $K$  (constante de unión aparente) y la  $K_x$  (constante de unión real).

Las isothermas de unión mostradas en la Figura 25 C indican que el péptido se une a los liposomas, presentando un coeficiente de reparto de  $1,9 \times 10^6$ . Mientras el  $K_x$  del PF-HIV-1 en presencia del P59 disminuye un orden de magnitud ( $2,7 \times 10^5$ ) indicando que el péptido E2 impide la unión del PF-HIV-1 a los liposomas [191].

Estudios realizados con monocapas lipídicas de PC/PS también mostraron la capacidad del P59 de interactuar con el PF-HIV-1. Los estudios con monocapas de Langmuir demostraron que tanto el PF-HIV-1 como el P59 se unían considerablemente a las membranas lipídicas. Sin embargo, cuando se analizó la mezcla equimolar de los dos péptidos se observó una disminución de la unión de los péptidos a los lípidos de membrana [191].

Finalmente, se confirmó la interacción entre los péptidos P59 y PF-HIV-1 mediante la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM). Se estudió la estructura y la reorganización de los dos péptidos y de la mezcla de ambos cuando se disponían sobre una superficie de mica. Se observó que el PF-HIV-1 formaba grandes agregados circulares (de altura 82 nm y diámetro 330 nm) distribuidos aleatoriamente a lo largo de la superficie, mientras que el P59 formaba agregados circulares de pequeño tamaño (altura 9,1 nm y diámetro 150 nm) y una delgada película que cubría toda la superficie de mica. Estas diferencias sugirieron que los péptidos interactúan de manera diferente con la mica, la cual es una superficie polar. Las imágenes obtenidas por AFM indicaron que el PF-HIV-1 interactúa preferentemente mediante interacciones hidrofóbicas formando grandes agregados en la superficie de la mica, mientras que el P59 se dispone sobre la mica formando una fina película debido a que prevalecen las interacciones de tipo electrostático. Cuando los péptidos PF-HIV-1 y P59 se mezclan en solución en una relación 1:5, antes de depositarlos en la superficie de la mica, aparecen estructuras anulares de aproximadamente

200 nm de diámetro, sugiriendo cambios morfológicos en la organización de los péptidos. Tal y como se ha descrito, parece que el péptido P59 estabiliza las moléculas de PF-HIV-1, mediante la formación de micelas mixtas [191].

Estos resultados confirman que se establece algún tipo de interacción entre el PF-HIV-1 y la región P59 de la proteína E2, que explicaría la inhibición observada en la actividad del PF-HIV-1.

## **2 DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS DE LA REGIÓN E1(22-39) DEL VIRUS GBV-C: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS AMINOÁCIDOS EN SU ESTRUCTURA PRIMARIA Y DE LA CARGA NETA EN SU CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL PF-HIV-1**

En nuestro grupo de investigación y en colaboración con el Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona se llevó a cabo, con la finalidad de contribuir a un mejor conocimiento de la interacción de las proteínas de envoltura del virus GBV-C con el virus del HIV-1, el estudio de la inhibición del proceso de entrada del HIV-1, provocado por el PF-HIV-1, inducida por péptidos derivados de la proteína de envoltura E1 del GBV-C [70, 107-109, 192, 193]. Se emplearon diferentes técnicas biofísicas como son la ITC, la microscopía confocal, y ensayos con monocapas de lípidos y fluorescencia y se seleccionaron ciertas secuencias de la proteína E1 capaces de interaccionar con el PF-HIV-1 [70, 108, 109]. Concretamente, los análisis demostraron que, la secuencia (22-39) de la proteína E1, denominada E1P8, era capaz de inhibir la fusión de membranas y la interacción del PF-HIV-1 con bicapas lipídicas [108]. A partir de estos resultados, esta secuencia peptídica de la proteína E1 fue propuesta como posible inhibidor de la entrada del HIV-1.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, uno de los objetivos principales planteados en esta tesis doctoral ha consistido en el diseño y la síntesis de derivados peptídicos de la región peptídica (22-39) de la proteína E1 del virus GBV-C con el fin mejorar su actividad anti-HIV-1.

En este capítulo se llevará cabo un estudio detallado de la influencia de cada aminoácido presente en la estructura primaria de E1P8, así como de su carga neta en su capacidad de inhibir al PF-HIV-1.

## 2.1 Síntesis múltiple de péptidos derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C

Con el fin de estudiar la influencia de los diferentes aminoácidos presentes en la estructura primaria del péptido E1P8, así como de su carga neta en su actividad anti-PF-HIV-1, se realizó la síntesis múltiple de 23 secuencias peptídicas lineales en un sintetizador semi-automático, según el procedimiento descrito en materiales y métodos. Para llevar a cabo tal estudio se realizó un “*screening*” de alanina, y se sustituyó cada uno de los aminoácidos de la secuencia por este aminoácido. Además, se analizó la influencia de la carga neta del péptido en su actividad mediante la sustitución de aminoácidos con carga negativa por aminoácidos con carga neutra o con carga positiva.

Se llevó a cabo la síntesis en fase sólida de los 23 análogos siguiendo una estrategia Fmoc/tBu. Para cada análogo se partió de 50 mg de resina Tentagel<sup>®</sup> Ram con un grado de funcionalización de 0,24 mmol/g. El procedimiento se llevó a cabo tal y como se describe en materiales y métodos. La incorporación de los aminoácidos se realizó con HATU y DIEA como activadores. Tanto los aminoácidos como los reactivos de acoplamiento se utilizaron con un exceso de 4 veces respecto a la cantidad mínima necesaria para el acoplamiento. El tiempo de reacción fue de 30 minutos para cada uno de los acoplamientos. El grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % en DMF. Finalizada la síntesis múltiple se procedió al desanclaje de los péptidos de la resina y la desprotección simultánea de las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales. Esta operación se realizó de manera manual utilizando medio ácido y la siguiente mezcla de capturadores: TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1).

Los crudos peptídicos obtenidos se caracterizaron por HPLC a escala analítica tal y como se ha descrito en materiales y métodos. Asimismo, se realizó un análisis por UPLC, ES-MS y de MALDI-TOF para confirmar la identidad de las secuencias peptídica sintetizadas.

Los péptidos obtenidos fueron desalados mediante columnas Oasis<sup>®</sup> HLB (Waters) tal y como se ha descrito en materiales y métodos. Estas columnas incorporan un copolímero

humedecible en agua que es óptimo para la limpieza de muestras de naturaleza peptídica. Los filtrados recogidos, se caracterizaron por HPLC analítico, UPLC y ES-MS con el fin de comprobar la presencia de los productos deseados.

La Tabla 8 muestra un resumen de la caracterización analítica de los péptidos obtenidos mediante la síntesis múltiple. En todos los casos la masa experimental obtenida coincidió con la masa teórica calculada.

**Tabla 8:** Caracterización de los análogos E1P8 del GBV-C mediante UPLC y ES-MS.

Péptido	Secuencia	UPLC (k') <sup>a</sup>	[M] <sup>+</sup> <sub>teor</sub>	[M] <sup>+</sup> <sub>exp</sub> <sup>b</sup>
<b>E1P8</b>	APEDIGFCLEGGCLVALG	5,3	1763,0	1762,9
<b>E1P8-1</b>	AAEDIGFCLEGGCLVALG	5,4	1737,0	1736,8
<b>E1P8-2</b>	APADIGFCLEGGCLVALG	6,7	1705,0	1704,8
<b>E1P8-3</b>	APEAIGFCLEGGCLVALG	6,6	1719,0	1718,8
<b>E1P8-4</b>	APEDAIGFCLEGGCLVALG	5,7	1720,9	1720,7
<b>E1P8-5</b>	APEDIAFCLEGGCLVALG	6,6	1777,1	1776,9
<b>E1P8-6</b>	APEDIGACLEGGCLVALG	5,7	1686,9	1685,7
<b>E1P8-7</b>	APEDIGFALEGGCLVALG	5,4	1731,0	1730,9
<b>E1P8-8</b>	APEDIGFCAEGGCLVALG	5,2	1720,9	1720,8
<b>E1P8-9</b>	APEDIGFCLAGGCLVALG	6,3	1705,0	1704,8
<b>E1P8-10</b>	APEDIGFCLAGCLVALG	6,9	1777,1	1776,9
<b>E1P8-11</b>	APEDIGFCLEGAACLVALG	7,0	1777,1	1776,9
<b>E1P8-12</b>	APEDIGFCLEGGALVALG	6,1	1731,0	1730,9
<b>E1P8-13</b>	APEDIGFCLEGGCAVALG	5,7	1720,9	1720,8
<b>E1P8-14</b>	APEDIGFCLEGGCLAALG	6,2	1735,0	1734,8
<b>E1P8-15</b>	APEDIGFCLEGGCLVAAG	5,4	1720,9	1720,8
<b>E1P8-16</b>	APEDIGFCLEGGCLVALA	6,1	1777,1	1776,9
<b>E1P8-17</b>	APQDIGFCLEGGCLVALG	6,3	1762,1	1761,9

Péptido	Secuencia	UPLC (k') <sup>a</sup>	[M] <sup>+</sup> <sub>teor</sub>	[M] <sup>+</sup> <sub>exp</sub> <sup>b</sup>
<b>E1P8-18</b>	APENIGFCLEGGCLVALG	6,4	1762,1	1761,8
<b>E1P8-19</b>	APEDIGFCLQGGCLVALG	6,3	1762,1	1761,8
<b>E1P8-20</b>	APQNIQFCLQGGCLVALG	6,0	1760,1	1857,9
<b>E1P8-21</b>	APRDIGFCLEGGCLVALG	6,4	1790,1	1789,9
<b>E1P8-22</b>	APRRIGFCLEGGCLVALG	5,7	1831,2	1829,9
<b>E1P8-23</b>	APRRIGFCLRGGCLVALG	5,7	1858,3	1857,7

<sup>a</sup> Condiciones de UPLC: (A) 10 mM de acetato de amonio en H<sub>2</sub>O; (B) 10 mM de acetato de amonio en Metanol. Gradiente lineal de B de 20% a 100% en 10 minutos a un flujo de 0,2 ml/min. <sup>b</sup> Masa experimental de los péptidos obtenida por ES-MS.

## 2.2 Síntesis, purificación y caracterización del péptido PF-HIV-1

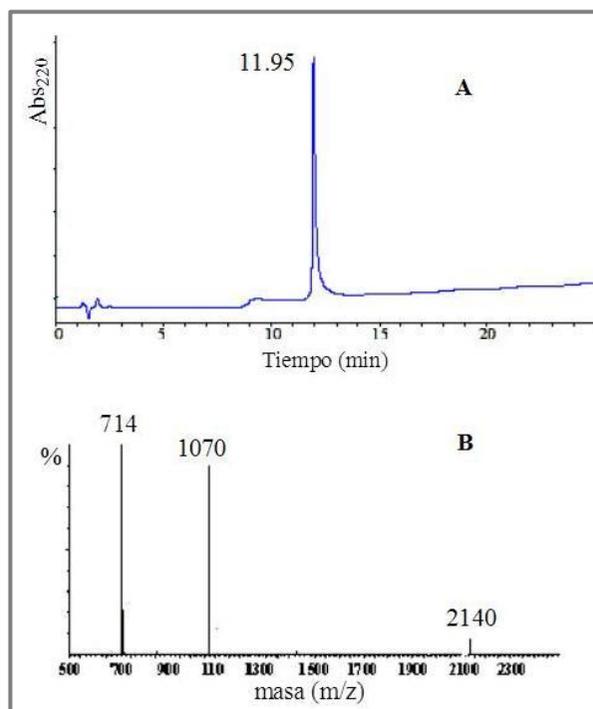
Para llevar a cabo los estudios biofísicos de interacción de los péptidos derivados de la glicoproteína E1 del GBV-C con el PF-HIV-1, se utilizó un análogo del PF-HIV-1 con una mayor solubilidad (R<sup>22</sup> [1-23] del gp41). Según la literatura [194], la presencia de arginina aumenta la capacidad del péptido de desestabilizar las membranas de las vesículas con carga negativa con una actividad mayor de aproximadamente del 70% respecto a la secuencia con alanina.

El PF-HIV-1 se sintetizó de forma manual en fase sólida utilizando la resina PAL-ChemMatrix con una funcionalidad inicial 0,4 mmol/g. Esta resina es ideal para la síntesis de secuencias hidrofóbicas difíciles de sintetizar, dada su agregación, como ocurre en el caso del PF-HIV-1 [147].

Tal y como se ha descrito en materiales y métodos, la síntesis se llevó a cabo mediante la estrategia Fmoc/ tBu. Se emplearon como activadores del grupo carboxilo HATU y DIEA. Para las incorporaciones de los aminoácidos se utilizaron excesos de tres veces tanto del aminoácido protegido como de los agentes de acoplamiento.

Se logró una fácil incorporación de los aminoácidos con un tiempo de acoplamiento de 30 minutos. Los tests de ninhidrina, cloranilo y TNBS dieron perlas amarillas en todos los

casos, indicando que el acoplamiento fue efectivo. Después de cada incorporación, se realizó la desprotección mediante dos lavados con piperidina, obteniéndose en todos los casos un resultado positivo del test. Finalizada la síntesis de las secuencias peptídicas, se procedió al secado de la peptidil-resina y se pesó la cantidad obtenida. El desanclaje se llevó a cabo utilizando la mezcla TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1%). El tiempo de reacción fue de 3 horas. El crudo peptídico se disolvió en ácido acético al 10% y se liofilizó. El crudo peptídico obtenido se caracterizó por HPLC a escala analítica tal y como se ha descrito en materiales y métodos. Se realizó un análisis por UPLC, ES-MS y MALDI-TOF para confirmar la identidad de la secuencia peptídica sintetizada.



**Figura 26:** A) Espectro de HPLC analítico del PF-HIV-1. Columna de fase reversa (Agilent) C<sub>18</sub> (4,6 x 100 mm) 3,5  $\mu$ m, gradiente lineal de A 95% a 5% en 25 minutos (A: H<sub>2</sub>O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA), a un flujo de 1 ml/min, detección 220 nm. B) Espectro de masas por ES-MS del péptido purificado: masa calculada = 2140,11; masa experimental = 2140.

Posteriormente se llevó a cabo la purificación del crudo peptídico mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución a escala preparativa. Para llevar a cabo la separación cromatográfica se utilizó una columna de fase reversa C<sub>8</sub>, un gradiente de 80% a 20% de H<sub>2</sub>O en 25 minutos, a un flujo de 3,2 ml/min. El péptido purificado se analizó mediante las técnicas de HPLC, ES-MS.

En la Figura 26 se muestra el cromatograma del PF-HIV-1 puro. Se puede observar que la separación cromatográfica fue efectiva obteniéndose una pureza  $\geq 95\%$ .

### **2.3 Estudios de interacción de los análogos de E1P8 con el PF-HIV-1 por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)**

La introducción a principios de los años 90 de una nueva tecnología de biosensores basada en el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (SPR, *surface plasmon resonance*) ha permitido la visualización a tiempo real del proceso de interacción entre biomoléculas [195-197]. Uno de los instrumentos más empleados es el modelo BIAcore™ desarrollado por BIACORE AB (Uppsala, Suecia). El BIAcore™ es capaz de monitorear de forma precisa y en tiempo real la interacción entre una biomolécula unida a la superficie del sensor (ligando) y otra que circula en disolución (analito) [198]. En los últimos años, la técnica de SPR se ha utilizado para el estudio de una gran variedad de interacciones, entre las que destacan las interacciones antígeno-anticuerpo y las interacciones de biomoléculas con modelos de membrana, prueba de ello es el gran número de publicaciones aparecidas en los últimos años [199-201]. Entre las aplicaciones de la técnica SPR destacan el estudio de identificación de epítomos, la determinación de patrones de interacción en la búsqueda de nuevas moléculas farmacológicamente activas, la determinación de constantes cinéticas de interacción entre biomoléculas [196, 202], los estudios conformacionales [203, 204] y de interacción con modelos de membrana [205, 206].

En la presente tesis, mediante la técnica del SPR se estudió la interacción de los análogos del péptido E1P8 con el PF-HIV-1.

La cinética de interacción de las biomoléculas en estudio se calculó mediante el programa BIAevaluation GxP. Para ello se consideró un modelo cinético de interacción homogéneo y de relación 1:1 entre las moléculas que interaccionan A y B, descrito por la ecuación (15):

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB]$$

(15)

donde  $k_a$  es la constante cinética de asociación en  $M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_d$  es la constante cinética de disociación en  $s^{-1}$ . Bajo las condiciones BIAcore, B es el ligando inmovilizado y A es el analito inyectado a una concentración constante (c), mediante flujo permanente sobre el chip. Considerando la respuesta (R) una medida de la concentración formada del complejo [AB], la ecuación (15) puede reescribirse como:

$$\frac{dR}{dt} = k_a c (R_{max} - R) - k_d R$$

(16)

siendo  $R_{max}$  la máxima capacidad de unión de la superficie que depende del número de puntos de unión de [B].

Las ecuaciones que empleó el programa BIAevaluation para el ajuste de los datos experimentales y la obtención de las constantes cinéticas de asociación ( $k_a$ ) y disociación ( $k_d$ ) fueron:

$$R = R_0^{-k_d t}$$

(17)

$$R = R_{eq} (1 - e^{-(k_a c + k_d)})$$

(18)

siendo  $R_0$  la respuesta al inicio de la disociación y  $R_{eq}$  la respuesta en el equilibrio, a  $dR/dt=0$ .

La afinidad de la interacción se determinó a partir del nivel de unión al equilibrio, es decir a señal constante, en función de la concentración de la muestra. Se determinó también a partir de las mediciones cinéticas, como la relación de las dos constantes de velocidad cinética:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

(19)

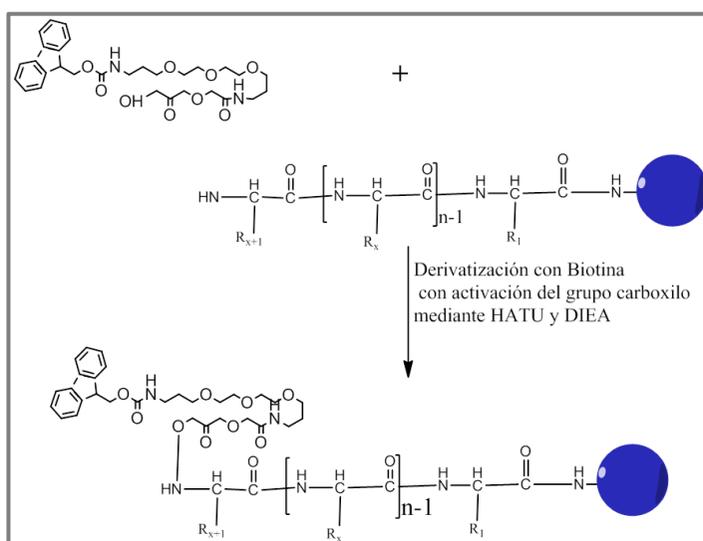
$$K_A = \frac{k_a}{k_d}$$

(20)

donde  $K_D$  es la constante de equilibrio de disociación en M y  $K_A$  es la constante de afinidad de la interacción en  $M^{-1}$ .

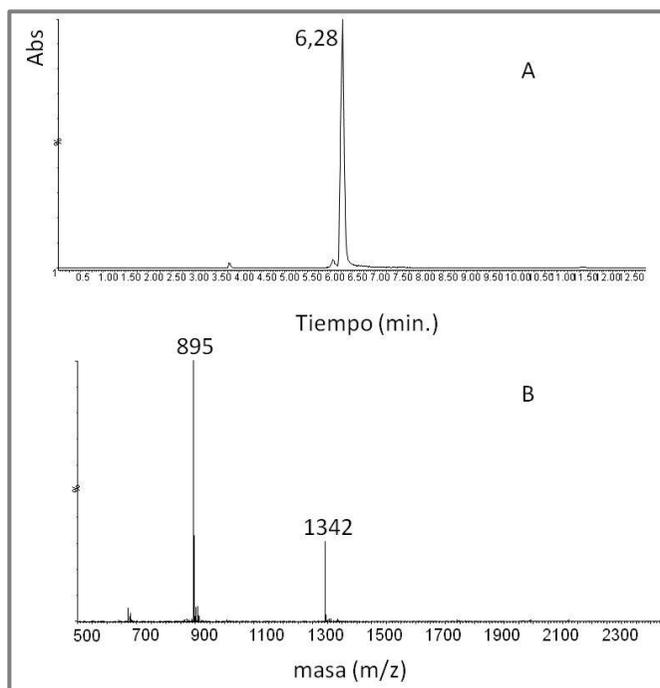
En primer lugar se llevó a cabo el marcaje del PF-HIV-1 con biotina mediante síntesis en fase sólida (Figura 27). Por ello, una vez terminada la síntesis del PF-HIV-1 y antes del desanclaje, se adicionó al extremo N-terminal de una fracción de 100 mg de peptidil-resina la biotina (N-biotyl-NH-(PEG)<sub>2</sub>-COOH) con dos grupos espaciadores PEG que evitan la agregación del péptido. La derivatización con biotina se realizó con los activadores HATU y

DIEA. Para la incorporación de la molécula se utilizaron excesos de cuatro veces tanto de la biotina como de los agente de acoplamiento. El tiempo de acoplamiento fue de aproximadamente 10 horas. Una vez marcado el PF-HIV-1 con biotina se llevó a cabo el desanclaje utilizando la mezcla TFA/H<sub>2</sub>O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1%). El tiempo de reacción fue de 3 horas. Se liofilizó el péptido resultante utilizando una disolución de ácido acético al 10%.



**Figura 27:** Esquema de la derivatización del PF-HIV-1 con N-biotyl-NH-(PEG)<sub>2</sub>-COOH mediante SPPS.

El péptido resultante Bio-PF-HIV-1 se caracterizó por UPLC y ES-MS (Figura 28).

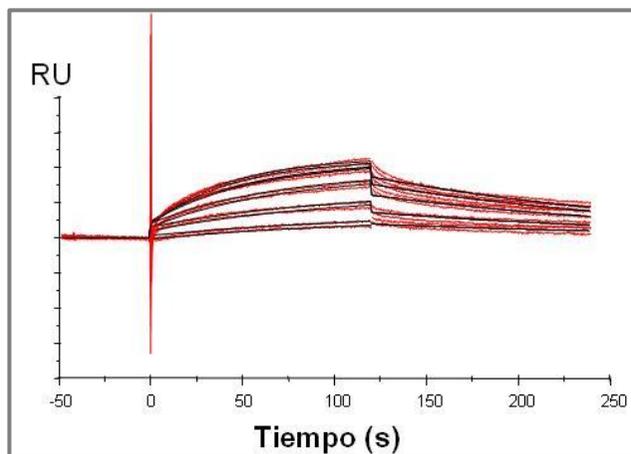


**Figura 28:** A) Espectro UPLC del péptido Bio-PF-HIV-1. Gradiente (A) 20 mM HCOOH en H<sub>2</sub>O; (B) 20 mM de HCOOH en ACN. Gradiente lineal de B de 20% a 100% en 12 minutos a un flujo de 0,3 ml/min. B) Espectro de masas experimental ES-MS: masa calculada 2684,19; masa experimental 2684.

A continuación, se llevó a cabo la inmovilización del péptido Bio-PF-HIV-1 a uno de los 4 canales del chip sensor (SA), derivatizado con estreptavidina, inyectando 10  $\mu$ l/min de una disolución de 35  $\mu$ M de péptido. Paralelamente, se inmovilizó biocitina (biotina unida a lisina) en otro canal del chip sensor con la finalidad de utilizarlo como referencia y así poder restar las interacciones inespecíficas.

Una vez preparada la superficie del chip sensor con el Bio-PF-HIV-1 inmovilizado, se inyectaron concentraciones crecientes de la secuencia peptídica EIP8 y de sus análogos, disueltos en 5% DMSO y en tampón HBSN. El flujo se mantuvo a 10  $\mu$ l/min para disminuir el efecto de transporte de masas.

Inicialmente se pasaron por los canales del chip concentraciones de analitos entre 2 y 100  $\mu\text{M}$ . Pero a estas concentraciones, tanto en el canal con el Bio-PF-HIV-1 inmovilizado como en el canal de referencia (biocitina), se registró un fuerte aumento de la señal, debido probablemente a la agregación de los analitos por un lado, y a interacciones inespecíficas con el chip por el otro. Por ello, se añadió al tampón donde se disolvían los péptidos 0,05% de TWEEN para impedir posibles agregaciones y se utilizaron concentraciones entre 1 y 0,25  $\mu\text{M}$  para evitar una respuesta demasiado alta.



**Figura 29:** Sensogramas de unión entre el péptido E1P8-20 y el Bio-PF-HIV-1. Concentración de E1P8-20 entre 0,25 y 1  $\mu\text{M}$ . Las líneas negras representan los sensogramas ajustados al modelo de unión de Langmuir.

En la Figura 29 se muestra uno de los sensogramas de interacción entre péptidos (E1P8-20 y Bio-PF-HIV-1). Se pueden distinguir las fases de asociación y disociación entre las moléculas, que se corresponden con el aumento y a continuación la disminución de la señal de las curvas, respectivamente.

El procesado de las zonas de asociación y disociación de los sensogramas por el programa BIAevaluation mediante las ecuaciones (17) y (18), dio lugar a los valores de  $k_a$  y  $k_d$ , y a partir de éstos se calcularon la  $K_A$  y la  $K_D$ , como se muestra en la Tabla 9.

**Tabla 9:** Parámetros cinéticos de unión entre los análogos E1P8 del GBV-C y el PF HIV-1 inmovilizado determinado por SPR.

Péptidos	SPR			
	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$k_D$ (M)	$k_A$ (M <sup>-1</sup> )
<b>E1P8</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-1</b>	8,2x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>-3</sup>	5,5x10 <sup>-7</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>
<b>E1P8-2</b>	1,1x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>-3</sup>	4,2x10 <sup>-7</sup>	2,4x10 <sup>6</sup>
<b>E1P8-3</b>	6,0x10 <sup>3</sup>	8,4x10 <sup>-3</sup>	1,4x10 <sup>-6</sup>	7,1x10 <sup>5</sup>
<b>E1P8-4</b>	6,9x10 <sup>3</sup>	4,7x10 <sup>-3</sup>	6,9x10 <sup>-7</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>
<b>E1P8-5</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-6</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-7</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-8</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-9</b>	1,0x10 <sup>4</sup>	5,4x10 <sup>-3</sup>	5,2x10 <sup>-7</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>
<b>E1P8-10</b>	5,8x10 <sup>3</sup>	6,6x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-6</sup>	8,8x10 <sup>5</sup>
<b>E1P8-11</b>	0,8x10 <sup>3</sup>	6,5x10 <sup>-3</sup>	7,9x10 <sup>-6</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>
<b>E1P8-12</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-13</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-14</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-15</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-16</b>	4,1x10 <sup>3</sup>	6,6x10 <sup>-3</sup>	1,6x10 <sup>-6</sup>	6,3x10 <sup>5</sup>
<b>E1P8-17</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-18</b>	3,0x10 <sup>3</sup>	6,7x10 <sup>-3</sup>	2,3x10 <sup>-6</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>
<b>E1P8-19</b>	8,4x10 <sup>3</sup>	5,8x10 <sup>-3</sup>	6,9x10 <sup>-7</sup>	1,5x10 <sup>6</sup>
<b>E1P8-20</b>	4,0x10 <sup>3</sup>	6,1x10 <sup>-3</sup>	1,5x10 <sup>-7</sup>	6,6x10 <sup>6</sup>
<b>E1P8-21</b>	4,6x10 <sup>3</sup>	5,1x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-6</sup>	9,0x10 <sup>6</sup>
<b>E1P8-22</b>	ND	ND	ND	ND
<b>E1P8-23</b>	ND	ND	ND	ND

ND no determinado.

No todas las secuencias peptídicas derivadas de la proteína E1 se ajustaron al modelo cinético propuesto por el programa BIAevaluation.

En particular, la interacción del E1P8 con el Bio-PF-HIV-1 no se ajustó a este modelo, por lo que no se pudo utilizar este ensayo para comparar el comportamiento de la secuencia nativa respecto a sus derivados.

De todas formas, en aquellos análogos en los que fue posible ajustar los sensogramas, se obtuvieron valores de  $K_D$  ( $\approx 10^{-6}$ - $10^{-7}$ ) iguales o de un orden magnitud menor respecto a los que se habían calculado para péptidos de la glicoproteína E2 del GBV-C seleccionados como inhibidores del PF-HIV-1 ( $K_D \approx 10^{-5}$ - $10^{-6}$ ) [69], sugiriendo que los derivados E1 interaccionan con el Bio-PF-HIV-1.

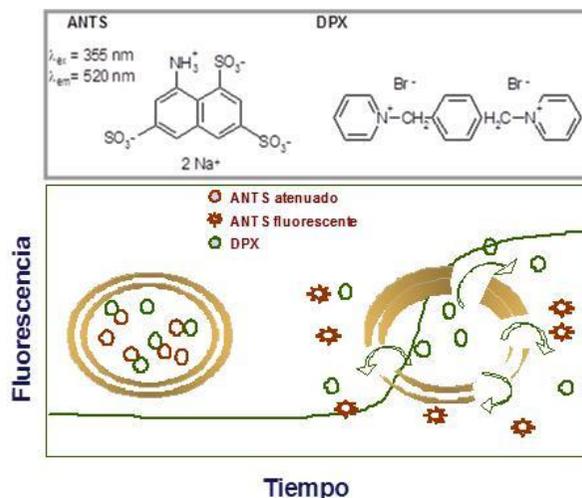
#### **2.4 Estudio de interacción de los análogos de E1P8 con PF-HIV-1 por el ensayo de liberación de contenidos vesiculares**

Con la finalidad de determinar la importancia de cada uno de los residuos de la secuencia E1P8 en la actividad inhibitoria del PF-HIV-1, se llevó a cabo un estudio biofísico de los 23 análogos peptídicos en cuanto a su capacidad de inhibir la liberación de los contenidos vesiculares inducida por el PF-HIV-1.

El PF-HIV-1 tiene capacidad de formar poros en las membranas lipídicas [69, 108, 176] y se aprovechó esta propiedad para realizar los ensayos de liberación del contenido vesicular. Para llevar a cabo este ensayo, se prepararon liposomas LUV de POPG por su gran estabilidad y porque se ha observado que el PF-HIV-1 se une más fuertemente a fosfolípidos con carga negativa que a aquellos lípidos que no tienen carga [167].

En este ensayo se utiliza la capacidad de la molécula bromuro de p-xileno-bis-piridinio (DPX) de atenuar la fluorescencia del ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6 trisulfónico (ANTS) por transferencia colisional (Figura 30). Cuando estas sondas se encuentran encapsuladas en el interior de los liposomas, la emisión del ANTS es mínima debido a que se encuentra

atenuada en su totalidad por el DPX. Tras la interacción con el PF-HIV-1 se produce permeabilización de las vesículas y las sondas fluorescentes salen al medio, se diluyen, con lo cual el DPX pierde su capacidad de atenuar la fluorescencia del ANTS y por lo tanto aumenta la intensidad de fluorescencia (Figura 30).



**Figura 30:** Estructura química de la sonda ANTS y DPX y esquema del ensayo de liberación de los contenidos vesiculares.

Previamente, en nuestro grupo de investigación se había demostrado que la secuencia peptídica E1P8 era capaz de inhibir el proceso de permeabilización de las membranas vesiculares (*leakage*) inducido por el PF-HIV-1 [108].

En la presente tesis doctoral se prepararon liposomas unilamelares LUV de POPG con la sondas ANTS y DPX encapsuladas en su interior, tal y como se ha descrito en materiales y métodos. Se buscó una concentración del PF-HIV-1 que provocara como mínimo el 50% de liberación del contenido vesicular en una solución de liposomas POPG de concentración 0,1 mM, y se analizó la capacidad intrínseca de los análogos del péptido E1P8 de inducir "*leakage*". Los resultados mostraron que los análogos E1P8 no provocaban la ruptura de LUVs de POPG. En una segunda fase del ensayo, se preincubó, durante 30 minutos en

DMSO, el PF-HIV-1 con los diferentes péptidos (a una relación 1:10, PF-HIV-1: E1 GBV-C) antes de adicionarlos a la suspensión de liposomas. Se registró la fluorescencia de emisión de la sonda ANTS a 520 nm de los liposomas solos, en presencia del PF-HIV-1, y finalmente en presencia de la mezcla PF-HIV-1/ E1 GBV-C. Se calculó el porcentaje de liberación del PF-HIV-1 solo y en presencia del E1P8 y de sus análogos aplicando la ecuación (21):

$$\% \text{ Liberación} = \frac{F_f - F_0}{F_{100} - F_0} \times 100$$

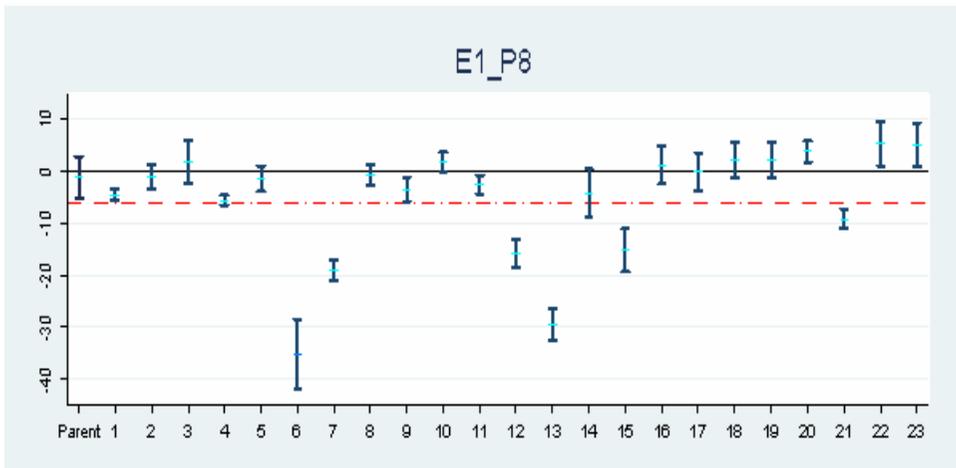
(21)

Siendo  $F_f$  el valor de la intensidad de fluorescencia tras la adición de los péptidos,  $F_0$  la intensidad de fluorescencia inicial de la suspensión de liposomas y  $F_{100}$  la intensidad de fluorescencia tras añadir el Tritón X-100.

El ensayo se repitió 5 veces y cada ensayo se realizó por triplicado, por lo que se obtuvieron 15 medidas para cada análogo E1 GBV-C/PF-HIV-1.

Los resultados se analizaron mediante el modelo estadístico de regresión de cuantiles [207]. Con este modelo se evaluó la relación existente entre la mediana de los valores de *leakage* del PF-HIV-1 y las medianas de los valores de *leakage* del PF-HIV-1 en presencia del E1P8 y de sus análogos. Se estimó la distancia entre la mediana de los valores correspondientes al PF-HIV-1 y los correspondientes a las mezclas mediante el coeficiente de regresión. Si la mediana del *leakage* de PF-HIV-1 estaba por encima de las medianas de las mezclas, el coeficiente de regresión era negativo, y significaba que se había producido una inhibición de la liberación de contenidos vesiculares inducida por el PF-HIV-1, y si no existía distancia significativa el coeficiente de regresión tendía a 0 y la inhibición del *leakage* del PF-HIV-1 no se consideraba significativa.

Tras el análisis de los resultados, se seleccionaron como inhibidores de la actividad de permeabilización del PF-HIV-1 aquellos péptidos que provocaban una reducción de liberación que tuviera un coeficiente de regresión  $\leq -6$ .



**Figura 31:** Efecto inhibitorio de los análogos E1P8 GBV-C sobre la capacidad del PF-HIV-1 de desestabilizar las membranas lipídicas de POPG. La relación molar ensayada PF-HIV-1 y péptidos derivados del GVB-C fue 1:10.

Tal y como se observa en la Figura 31, los análogos E1P8-6, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13, E1P8-15 y E1P8-21 inhiben significativamente el *leakage* del PF-HIV-1 [208], mientras que la secuencia nativa E1P8 no es capaz de inhibir la actividad del PF-HIV-1 en este ensayo, contrariamente a lo que se había visto con anterioridad [108]. Una posible explicación de estos resultados discrepantes podría ser que, en este trabajo de tesis, se utilizó un PF-HIV-1 con la alanina en posición 22 sustituida por una arginina, modificación que aumenta la actividad del péptido [167]. En este sentido, en un trabajo de master (M. Escarrá 2012), realizado en la Unidad de Síntesis y Aplicaciones Biomédicas de Péptidos, se llevó a cabo un estudio comparativo de la capacidad del E1P8 de inhibir el *leakage* del PF-HIV-1<sub>ala</sub> y del PF-HIV-1<sub>arg</sub>. Resultó que el péptido E1P8 inhibía la liberación de los contenidos vesiculares

del PF-HIV-1<sub>ala</sub> a todas las relaciones molares ensayadas, mientras no modificaba la actividad de desestabilización inducida por PF-HIV-1<sub>arg</sub>.

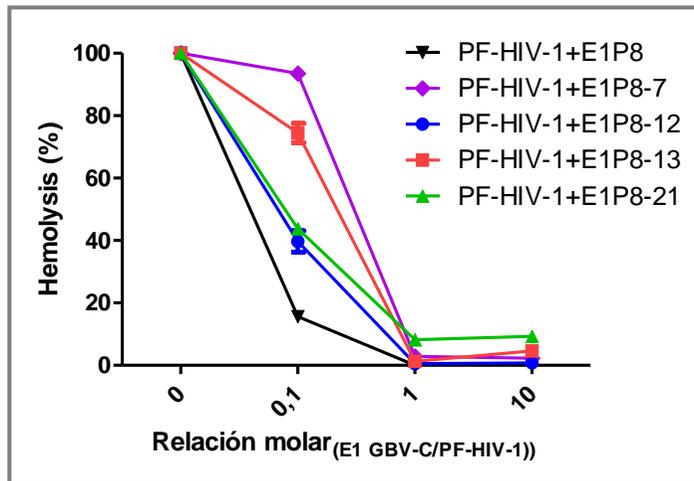
Por lo tanto, a partir de este ensayo preliminar se seleccionaron los derivados E1P8-6, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13, E1P8-15 y E1P8-21 como aquéllos que mejoraban la actividad de la secuencia nativa.

## **2.5 Estudio de interacción de los péptidos derivados E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C con el PF-HIV-1 mediante el ensayo de hemólisis**

El PF-HIV-1 en contacto con glóbulos rojos causa hemólisis, provocando un aumento de absorbancia debido a la liberación de hemoglobina [175]. En la literatura se describen péptidos, como el VIRIP y sus derivados, que bloquean la infección del virus del HIV-1 tras la interacción con el PF-HIV-1, y que inhiben también la actividad hemolítica del PF-HIV-1 [95].

Para estudiar la influencia de algunos análogos del péptido E1P8 del GBV-C, previamente seleccionados por su capacidad de inhibición según el ensayo de liberación de contenidos vesiculares, sobre la actividad hemolítica causada por PF-HIV-1, se puso a punto un ensayo de hemólisis empleando sangre de conejo.

Considerando el valor de absorbancia en presencia de PF-HIV-1 como valor máximo de hemólisis (100%), se observó que a medida que se iban añadiendo concentraciones crecientes de los péptidos derivados de E1P8 disminuía el porcentaje de hemólisis del PF-HIV-1 (Figura 32).



**Figura 32:** Efecto inhibitorio de los análogos E1P8 GBV-C sobre la actividad hemolítica del PF-HIV-1. Las relaciones molares ensayadas de los péptidos derivados del GVB-C y el PF-HIV-1 fueron 1:0,1, 1:1 y 1:10.

Tal y como se muestra en la Figura 32, el E1P8, ya a la relación molar 1:0,1 (PF-HIV-1: E1 GBV-C), afecta de manera drástica a la actividad hemolítica del PF-HIV-1 disminuyéndola en un 85%. Los péptidos E1P8-12 y E1P8-21 también son capaces de inhibir la hemólisis inducida por el PF-HIV-1. Menos marcada es la influencia de los péptidos E1P8-7 y E1P8-13 ya que la hemólisis inducida por el PF-HIV-1 disminuyó menos del 10% y 30%, respectivamente. A las relaciones PF-HIV-1/E1 GBV-C1:1 y 1:10 el comportamiento de los péptidos es parecido, alcanzando en todos los casos casi el 100% de la inhibición de la actividad hemolítica del PF-HIV-1. Los resultados muestran que todos los derivados ensayados de E1 GBV-C inhiben la actividad hemolítica del PF-HIV-1 de manera dosis-dependiente.

## 2.6 Cinética de adsorción de las secuencias peptídicas E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C

Tanto los estudios de cinética así como los de monocapas de compresión se llevaron a cabo en el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de la Universidad de Barcelona bajo la

dirección de la Dra M. Pujol, gracias a la colaboración existente entre la Dra M. Pujol y el USIBAP.

Se ha descrito que ciertas secuencias peptídicas de la glicoproteína E1 del GBV-C que interaccionan con el PF-HIV-1, presentan actividad superficial [70]. Se comportan como sustancias anfifílicas, al ser inyectadas en una subfase acuosa, se acumulan en la interfase aire/agua, disminuyendo, de este modo, la tensión superficial de subfase acuosa y aumentando la presión superficial en la interfase

Mediante la realización de cinéticas de adsorción se caracterizaron los péptidos sintetizados: E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21, en base a sus propiedades superficiales.

El proceso de adsorción del E1P8 y sus derivados se determinó inyectando volúmenes crecientes de una solución concentrada de los mismos en una subfase acuosa de Hepes 5 mM, a pH 7,4, registrándose los incrementos de la presión superficial durante un periodo de dos horas. Se alcanzó el equilibrio al cabo de 100 minutos.

Los péptidos muestran un comportamiento similar, una lenta adsorción a concentraciones bajas. A medida que aumenta la concentración de los péptidos la incorporación es más rápida y las presiones superficiales que alcanzan son más altas.

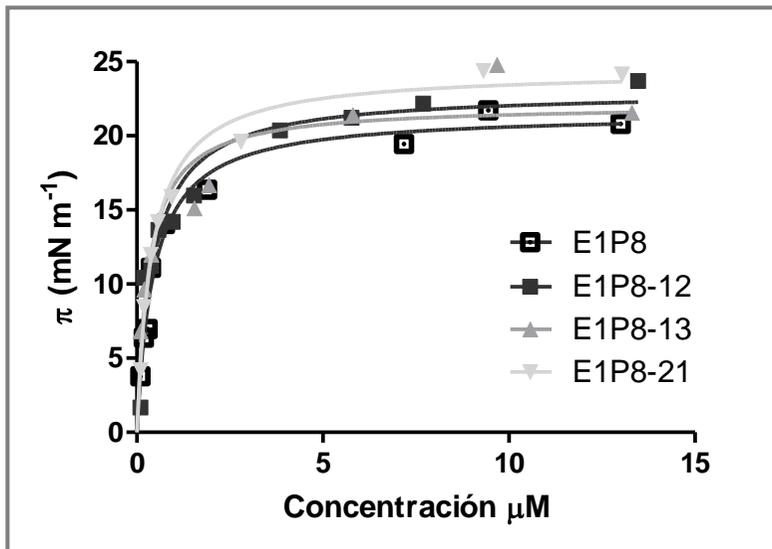
En la Figura 33 se representan los incrementos de presión superficial ( $\Delta\pi$ ) alcanzados en una cinética de 100 minutos para cada una de las concentraciones de péptidos ensayadas. El perfil obtenido se ajustaba a una hipérbola rectangular (ecuación (22)):

$$\Delta\pi = \frac{c\pi_{max}}{k + c}$$

(22)

Donde  $\pi_{max}$  es el máximo incremento de presión superficial,  $c$  es la concentración de péptido en la subfase,  $K$  es la concentración que se alcanza a  $\frac{1}{2} \pi_{max}$ , que generalmente se toma

como referencia para los estudios de cinética de penetración, esta debe ser más baja que la presión de equilibrio de adsorción del péptido [167].



**Figura 33:** Medida de la presión superficial del péptido E1P8 y sus derivados E1P-12, E1P-13 y E1P8-21, a diferentes concentraciones de los mismos en la subfase.

A partir de estos datos se ha calculado el exceso superficial de los péptidos ( $\Gamma$ ), aplicando a los valores obtenidos en el registro de incremento de presión superficial frente al tiempo, la ecuación que define la isoterma de adsorción de Gibbs:

$$\Gamma = \frac{\Delta\pi}{RT\Delta\ln c}$$

(23)

Donde R es la constante de gas ( $8,31 \text{ J K}^{-1}\text{mol}$ ), T es la temperatura a la que se realizó el experimento (294 K),  $c$  es la concentración de péptido en la subfase y  $\Delta\pi$  el incremento de presión a los 100 minutos.

Además se han calculado las correspondientes áreas por molécula utilizando la ecuación ((24):

$$Area = \frac{1}{NT}$$

(24)

Siendo N el número de Avogadro  $6,022 \times 10^{23}$  moléculas  $\text{mol}^{-1}$ .

Los parámetros calculados para cada péptido se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10:** Valores de las isothermas de adsorción del E1P8 GVB-C y de sus derivados E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21.  $\Pi_{max}$  es el incremento de presión superficial,  $K$  la concentración que alcanza  $\frac{1}{2} \pi_{max}$ ,  $\Gamma_{max}$  es el exceso superficial de péptido en la subfase al equilibrio y  $A$  es la área por molécula.

	$\Pi_{max}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$K$ (μM)	$\Gamma_{max}$ (mol m <sup>-2</sup> )	$A$ (nm <sup>2</sup> molec <sup>-1</sup> )
<b>E1P8</b>	22	0,45	$1,53 \times 10^{-6}$	1,06
<b>E1P8-12</b>	23	0,44	$1,59 \times 10^{-6}$	1,04
<b>E1P8-13</b>	22	0,32	$1,48 \times 10^{-6}$	1,12
<b>E1P8-21</b>	24	0,42	$1,52 \times 10^{-6}$	1,09

Los análogos muestran una cinética de adsorción similar a la secuencia original E1P8, como cabía esperar por su parecido perfil hidrofóbico según la escala de Hoop-Woods. En esta escala, que permite predecir regiones antigénicas potenciales de polipéptidos, valores mayores a 0 indican regiones hidrofílicas y, por consiguiente, las que están más expuestas en la superficie de una proteína en su conformación nativa. Por otro lado, los valores obtenidos son del mismo orden que los obtenidos para otros péptidos de las proteínas estructurales E1 y E2 de virus GBV-C de longitud y perfil similar [70, 107, 191].

El péptido E1P8 y los derivados (E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21) presentan valores negativos desde el residuo 4 al 15 [70] de ahí que los parámetros superficiales, como los valores de

$\pi_{max}$  resultaron comprendidos entre 22 y 24 mN m<sup>-1</sup> y, las áreas por molécula entre 1,04 y 1,12 nm<sup>2</sup> molec<sup>-1</sup>.

Los resultados muestran que los péptidos presentan propiedades superficiales similares. En todos los casos a medida que la concentración aumenta se observa una adsorción gradual de los péptidos. Por consiguiente, se puede afirmar que la sustitución de los aminoácidos en las secuencias peptídicas E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 no conlleva ningún cambio significativo en sus propiedades superficiales respecto a las de la secuencia nativa. Además, la carga tampoco parece ser significativa, ya que el péptido E1P8-21, siendo neutro con respecto a la secuencia nativa, presenta la misma actividad superficial.

## **2.7 Cinética de penetración a área constante del péptido PF-HIV-1 y de las secuencias peptídicas E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C**

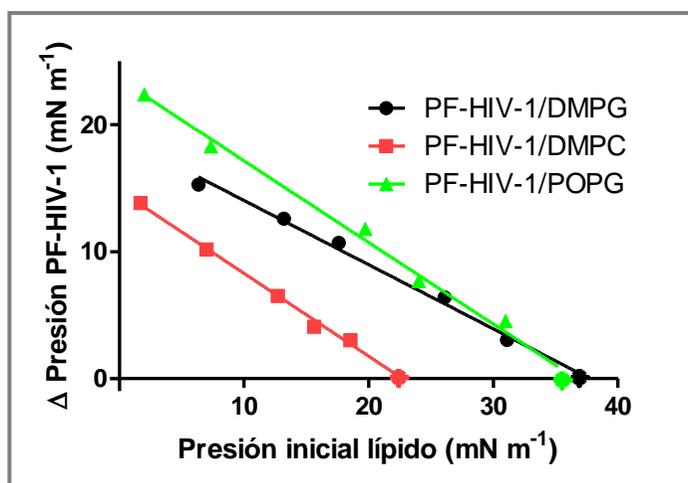
Las cinéticas de penetración de péptidos en monocapas de lípidos son útiles para analizar las interacciones entre estas moléculas y las membranas, ya que proporcionan información que se puede extrapolar a la interacción de péptidos con lípidos organizados en bicapas, tal y como se encuentran en las membranas biológicas.

Con estos ensayos se estudió la capacidad de los péptidos de interactuar con monocapas fosfolípidicas obtenidas por extensión de un lípido en la interfase aire/agua a distintas presiones iniciales de lípido ( $\pi_i$ ). Se registraron los cambios de la presión inicial al incorporarse los péptidos a la interfase.

La concentración de los péptidos inyectada en la subfase (Hepes 5 mM, pH 7,4) fue 0,38  $\mu$ M, valor promedio de los valores  $K$  obtenidos en el ensayo de la actividad superficial para los péptidos estudiados.

En primer lugar se determinó la penetración del PF-HIV-1 utilizando como modelos de membrana fosfolípidos DMPC y DMPG que se diferencian en la carga de la cabeza polar (zwitterionica y negativa, respectivamente) (Figura 34).

El PF-HIV-1 muestra valores similares de penetración para los dos lípidos. En ambos casos se obtiene una dependencia lineal de incremento de presión ( $\Delta\pi$ ) y la presión inicial de la monocapa, como se muestra en la Figura 34.

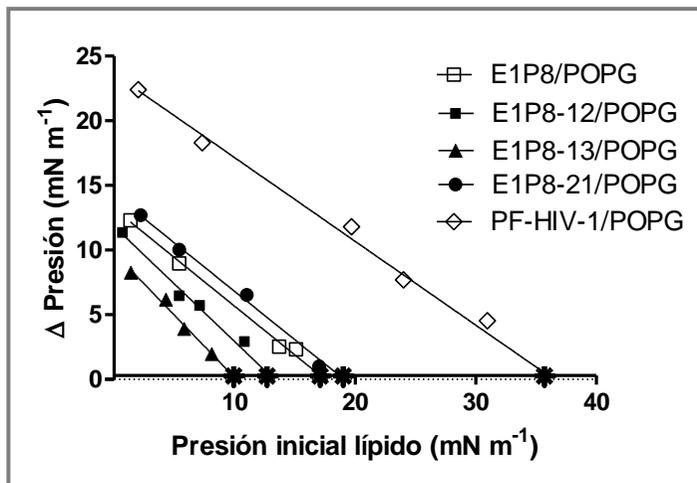


**Figura 34:** Incremento de la presión superficial ( $\Delta\pi$ ) causada de la inserción del PF-HIV-1 en monocapas de DMPG, DMPC y POPG en función de las presiones superficiales iniciales del lípido. El símbolo \* indica la presión de exclusión del péptido ( $\pi_e$ ).

La extrapolación de estas rectas ( $\Delta\pi$ =cero) proporciona un valor estimado de la presión de exclusión ( $\pi_e$ ), es decir aquella presión a la cual el PF-HIV-1 no se insertaría en la monocapa lipídica [132, 209]. Por otra parte, dado que la presión lateral de la membrana celular se ha estimado entre 25 y 35 mN m<sup>-1</sup>, los valores que se encuentran por debajo de este rango indican una baja penetración, mientras se ha descrito que los compuestos que interaccionan con la membrana celular presentan valores de  $\pi_e \geq 35$  mN m<sup>-1</sup> [210]. Se observa que la incorporación del PF-HIV-1 es más elevada en el caso de DMPG, indicando que hay que considerar la carga de la parte polar en el proceso de inserción. Sin embargo al estudiar la influencia de la cadena apolar en la interacción del PF-HIV-1 con la monocapa, mediante POPG que, a diferencia de DMPG, presentan una cadena lipídica distinta, más

larga y con insaturación, el valor de presión de exclusión es el mismo en ambos casos indicando que el péptido interactúa principalmente con la cabeza polar.

Se estudió, finalmente, la interacción del E1P8 y de los análogos E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 con el lípido POPG.



**Figura 35:** Incremento de la presión superficial ( $\Delta\pi$ ) causada por la inserción del PF-HIV-1, E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P-21 en monocapas de POPG en función de las presiones superficiales iniciales del lípido. El símbolo \* indica la presión de exclusión del péptido ( $\pi_e$ ).

Cada péptido muestra (Figura 35), una tendencia lineal de  $\Delta\pi$  frente a la  $\pi_i$ . Se observa que cuanto mayor es la concentración de lípido menor es el grado de incorporación de los péptidos.

Las presiones de exclusión para las secuencias peptídicas E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21, respectivamente 17, 13, 10 y 19  $\text{mN m}^{-1}$ , indican una baja interacción con los lípidos POPG. A estas presiones superficiales la monocapa de POPG, como se mostrará en el siguiente apartado, está en fase expandida, es decir las moléculas, aunque haya interacción de Van der Waals entre ellas, se encuentran separadas. Probablemente, en este estado de las películas lipídicas, los péptidos interactúan con el lípido POPG principalmente mediante

interacciones hidrofóbicas y la ausencia de penetración es debida a la carga neta negativa de los péptidos (Tabla 11), a diferencia del PF-HIV-1 que presenta una carga neta positiva y una presión de exclusión más elevada ( $35 \text{ mN m}^{-1}$ ).

**Tabla 11:** Valores del punto isoeléctrico y carga neta obtenidos por predicción, y valores de la presión de exclusión, obtenidos por extrapolación de los valores experimentales para los péptidos: PF-HIV-1, E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21.

Péptido	Punto isoeléctrico	Carga neta a pH 7,4	$\Pi_e$ ( $\text{mN m}^{-1}$ )
PF HIV-1	11,04	1	35
E1P8	2,94	-2,1	17
E1P8-12	2,94	-2	13
E1P8-13	2,94	-2,1	10
E1P8-21	4,04	0	19

## 2.8 Estudios de miscibilidad de los péptidos E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C y del PF-HIV-1 empleando monocapas de extensión

Tal y como se ha indicado, la disposición de una monocapa lipídica es similar a la de las membranas celulares, por lo que se utilizan como modelos de membrana.

En particular las monocapas mixtas, constituidas por dos o más componentes, representan un modelo muy válido para el estudio de las interacciones moleculares en un sistema bidimensional dinámico

Empleando las monocapas de extensión se analizaron las isoterms de compresión para estudiar en primer lugar la interacción entre el PF-HIV-1 y los derivados de E1P8. A continuación, se analizó la interacción entre los derivados de E1P8 y lípidos aniónicos y

finalmente se analizó la capacidad de estos péptidos de modificar la interacción del PF-HIV-1 con lípidos cargados negativamente.

### **2.8.1 Miscibilidad péptido/péptido**

Mediante las isotermas de compresión, se estudió la miscibilidad de la secuencia peptídica E1P8 del GBV-C y de sus derivados E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 con el PF-HIV-1. Se caracterizaron sus estados de ordenación superficial mediante el cálculo del módulo de compresibilidad siguiendo la ecuación (25):

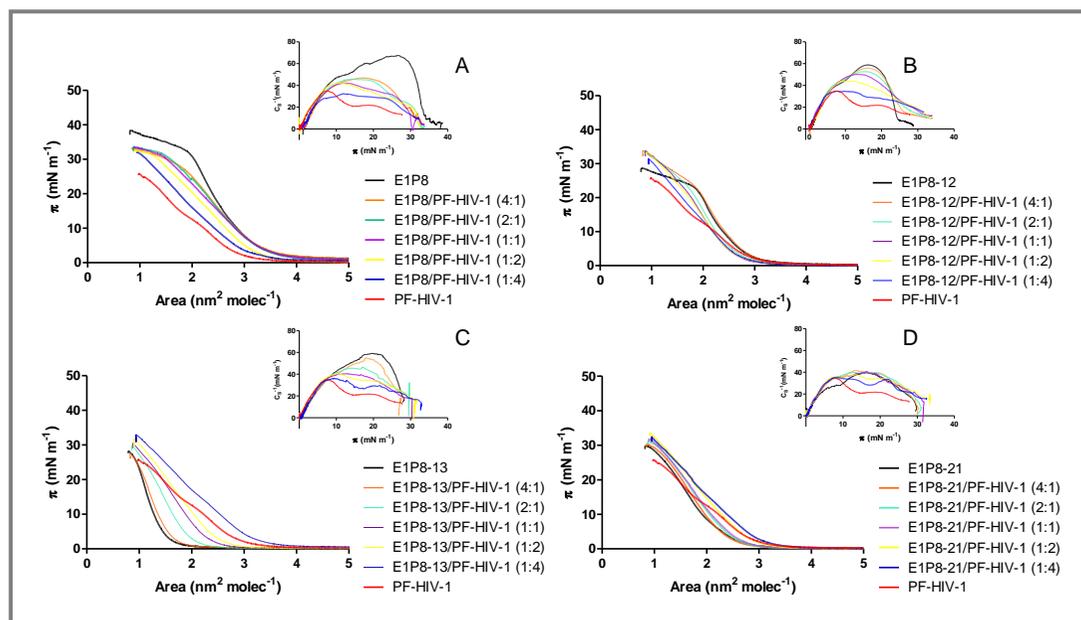
$$c_s^{-1} = -A \left( \frac{\delta\pi}{\delta A} \right)$$

(25)

Siendo  $A$  el área por molécula a una determinada presión superficial,  $\pi$  la presión superficial correspondiente.

Valores de módulo de compresibilidad entre 12,5 y 50 mN m<sup>-1</sup> indican una fase de líquido expandido de la monocapa, mientras valores comprendidos entre 100 y 250 mN m<sup>-1</sup> sugieren que la capa monomolecular está en fase de líquido condensado [211-213].

La compresión de las monocapas se realizó lentamente, a una velocidad de 5 cm min<sup>-1</sup>, para asegurar de que los cambios se produjeran en condición de equilibrio termodinámico [132].



**Figura 36:** Isothermas de compresión de monocapas mixtas del PF-HIV-1 con (A) E1P8, (B) E1P8-12, (C) E1P8-13 y (D) E1P8-21 extendidos sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), a diferentes fracciones molares de péptidos. En el *inset* los respectivos módulos de compresibilidad.

La Figura 36 muestra las isothermas de compresión de los péptidos E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 puros y de las mezclas a diferentes fracciones molares con el PF-HIV-1. Todas las secuencias peptídicas analizadas forman películas estables en la interfase aire/agua. En el caso de E1P8 se forma un *pseudoplateau* durante la compresión a una presión superficial de  $35 \text{ mN m}^{-1}$ . El mismo *pseudoplateau* se observa para el péptido derivado E1P8-12 a  $25 \text{ mN m}^{-1}$ . Un *plateau* similar se registró en isothermas de compresión de otras secuencias peptídicas de la glicoproteína E1 del GBV-C [193], y se ha visto que podría ser el resultado de la formación de una bicapa [214], o de unos segmentos moleculares que se disponen perpendicularmente a la interfase y salen del agua [215], o a un cambio de orientación del péptido durante la compresión [216]. Los derivados E1P8-13 y E1P8-21 muestran un aumento continuo de la presión superficial a medida que se comprimen las monocapas.

En general, se observa que cuando se añade el PF-HIV-1, la forma de las isothermas de los péptidos cambia. El *pseudoplateau* característico de los péptidos E1P8 y E1P8-12 desaparece a medida que aumenta la concentración del PF-HIV-1.

El módulo de compresibilidad del PF-HIV-1 frente a la presión superficial (*inset* Figura 36) indica que la monocapa está en una fase de líquido expandido durante toda la compresión. La adición de los derivados de la proteína E1 causa un aumento del módulo de compresibilidad, excepto para el E1P8-21. Aunque en las isothermas de los péptidos puros y de las mezclas no se observan cambios en el estados de ordenación de las moléculas.

La miscibilidad de los péptidos se ha evaluado mediante la regla de la aditividad que considera el área ocupada por molécula para las diferentes fracciones molares (ecuación(26)).

$$A_{1,2} = X_1A_1 + X_2A_2$$

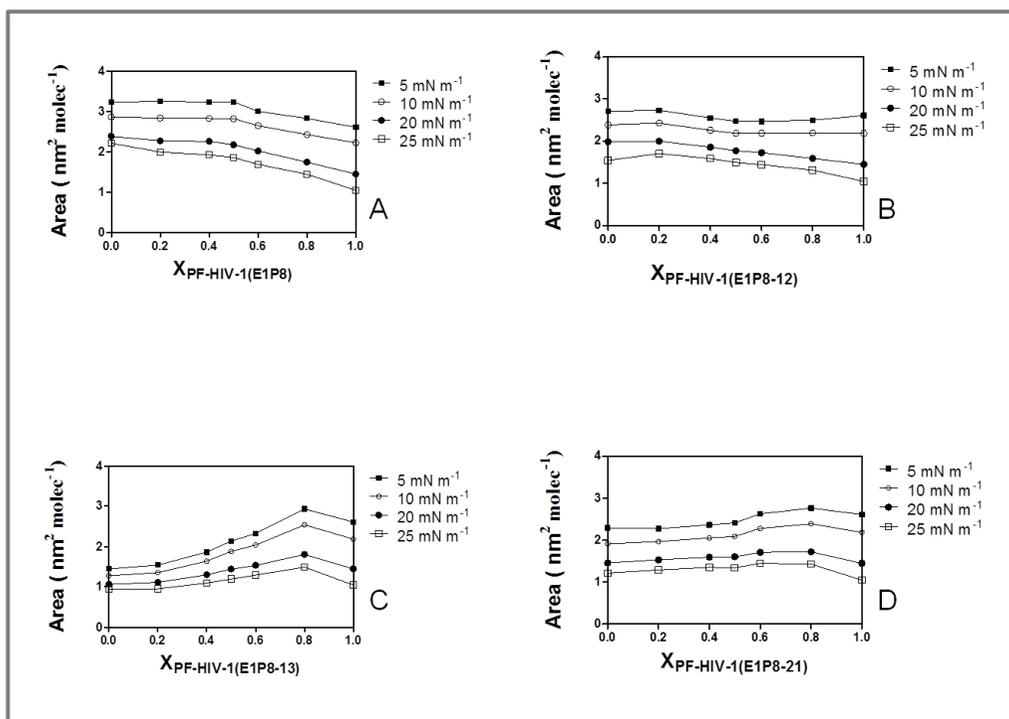
(26)

Siendo  $A_{1,2}$  el área por molécula media de la monocapa mixta,  $X_1$  y  $X_2$  las fracciones molares de los dos componentes, y  $A_1$  y  $A_2$  las áreas por molécula de ambos componentes en estado puro.

Si la mezcla es ideal, existe total miscibilidad de los componentes o total immiscibilidad y el área ocupada por molécula sigue un comportamiento lineal. Por tanto, los distintos componentes están mezclados y entre ellos no hay energía de interacción o bien responde al caso contrario, donde sus componentes están totalmente separados. Si el área por molécula presenta desviaciones negativas o positivas de la regla de la aditividad significa que los distintos componentes, interaccionan con más o menos extensión [217].

Los gráficos de las áreas por molécula frente a las fracciones molares del PF-HIV-1 a presiones constantes (5, 10, 20 y 25  $\text{mN m}^{-1}$ ) (Figura 37), revelan pequeñas desviaciones

positivas en todas las mezclas, excepto para el caso de E1P8-12/PF-HIV-1, a 5 mN m<sup>-1</sup>, que presenta desviaciones negativas indicando ligeras interacciones atractivas.



**Figura 37:** Variación del área por molécula de las isothermas mixtas de PF-HIV-1 con (A) E1P8, (B) E1P8-12, (C) E1P8-13 y (D) E1P8-21 extendidas sobre la subfase (Hepes 5 mM, pH 7,4), en función de la fracción molar del PF-HIV-1, a las presiones superficiales 5 mN m<sup>-1</sup>, 10 mN m<sup>-1</sup>, 20 mN m<sup>-1</sup> y 25 mN m<sup>-1</sup>.

Para analizar las características de la miscibilidad entre los componentes de las diferentes monocapas, se calcularon los parámetros asociados al proceso. La energía de Gibbs de exceso de la mezcla ( $G^E$ ) se obtuvo aplicando la siguiente ecuación (27) [218]:

$$G^E = N_A \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_{1,2} d\pi - X_1 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_1 d\pi - X_2 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_2 d\pi$$

(27)

donde  $A_{1,2}$  es el área molecular promedio de la monocapa mixta,  $A_1$  y  $A_2$  son las áreas de los componentes puros,  $X_1$  y  $X_2$  son las fracciones molares de los componentes 1 y 2,  $N_A$  es el número de Avogadro.

En la Tabla 12 se muestran los valores de energías de Gibbs de exceso de las mezclas. Estos se analizaron de acuerdo a que valores de  $|G^E|$  menores de RT indican desviaciones no significativas [136], sugiriendo que las interacciones entre los péptidos pueden considerarse ideales.

**Tabla 12:** Energía de Gibbs de exceso ( $G^E$ ) para las mezclas de PF-HIV-1 con E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21, a las presiones superficiales de 5 mN m<sup>-1</sup>, 10 mN m<sup>-1</sup>, 20 mN m<sup>-1</sup> y 25 mN m<sup>-1</sup>.

$X_{\text{PF-HIV-1}}$	$\Pi$ (mN m <sup>-1</sup> )	$G^E$ (J mol <sup>-1</sup> )			
		E1P8	E1P8-12	E1P8-13	E1P8-21
0,2	5	402,06	-606,50	959,04	-347,21
	10	511,82	-912,33	1190,75	-359,50
	20	318,34	-1690,48	1925,13	-706,27
	25	-400,26	-3568,82	1533,82	-1744,03
0,4	5	-919,39	-438,01	-339,90	-421,70
	10	-1012,88	-789,41	-416,36	-562,23
	20	-1072,33	-2060,14	-708,15	-1160,74
	25	-823,71	-4024,37	-1349,42	-2207,55
0,6	5	-91,86	-403,20	-432,48	-387,81
	10	23,37	-651,11	-625,39	-687,72
	20	-147,35	-1923,86	-1370,83	-1737,03
	25	827,84	-4146,71	-1714,94	-2673,86
0,8	5	467,40	-226,44	-36,79	-148,92
	10	675,24	-333,65	-209,33	-482,77
	20	1006,57	-789,03	-847,57	-1161,76
	25	1828,66	-2723,05	-992,09	-1666,21

La mezcla E1P8-12/PF-HIV-1, a 25 mN m<sup>-1</sup> de presión superficial, presenta valores de  $|G^E|$  mayores que RT (2477,5 J/mol, a 24 °C), indicando, en este caso, que las desviaciones positivas de la regla del aditividad son significativas, de carácter repulsivo y favorecidas

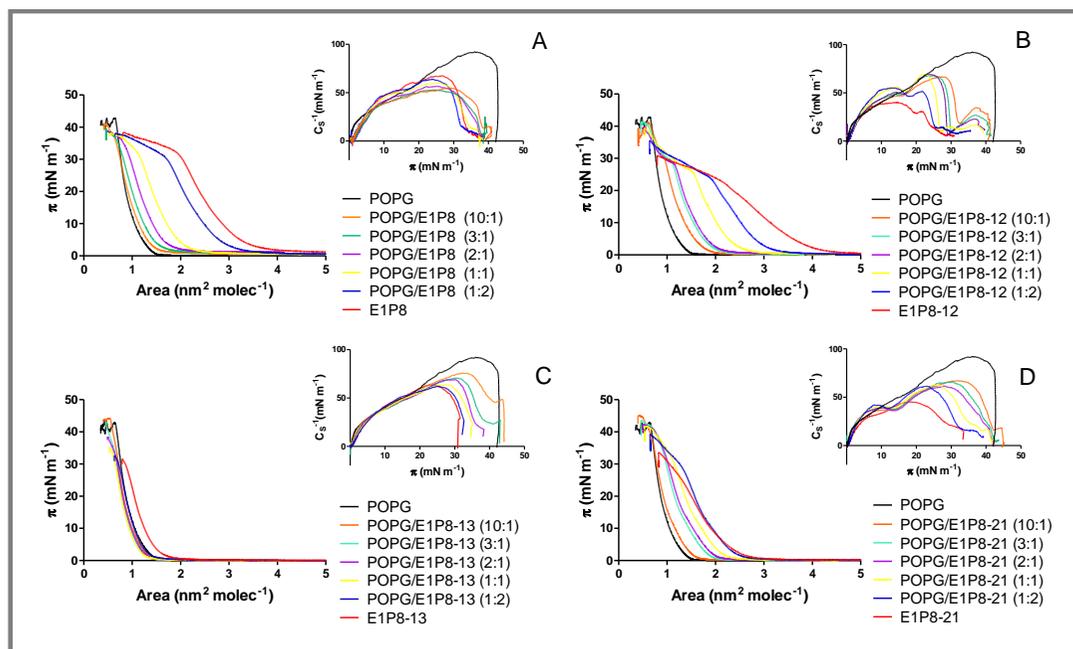
termodinámicamente. Las mezclas restantes muestran valores de  $|G^E|$  menores que el producto RT, indicando que las desviaciones de la idealidad observadas no son significativas.

Por lo tanto, las mezclas de péptidos se pueden considerar ideales [136], tal como cabía esperar puesto el perfil hidrofóbico de los derivados de la proteína E1 del GBV-C y del PF-HIV-1.

### **2.8.2 Miscibilidad péptido/lípido**

Para conocer el comportamiento de los péptidos E1P8, E1P8-12, E1P8-13, E1P8-21 y PF-HIV-1 en un sistema dinámico, se eligió POPG como modelo de membrana y se procedió al estudio de miscibilidad lípido/péptido obteniendo isotermas de compresión para mezclas de diferente composición.

En la Figura 38 se representan las isotermas de compresión obtenidas para cada una de las mezclas. Las curvas en color rojo corresponden a cada uno de los péptidos de la proteína E1 GBV-C solos, cuyo comportamiento se ha descrito en el apartado anterior. En este caso se ha analizado el efecto de los péptidos derivados de la proteína E1 del GBV sobre las monocapas del fosfolípido POPG. El E1P8 y sus derivados (excepto E1P8-13) muestran el mismo comportamiento. A mayor proporción de péptido en la monocapa, se produce una expansión de la monocapa del fosfolípido puro, los valores de área por molécula aumentan con la fracción molar de péptido en la monocapa para una misma presión, hecho que indica interacción entre los péptidos y el lípido [165]. En la mezcla E1P8-13/POPG, el área por molécula del lípido no varía al añadir el péptido, en ninguna de las fracciones molares ensayadas.

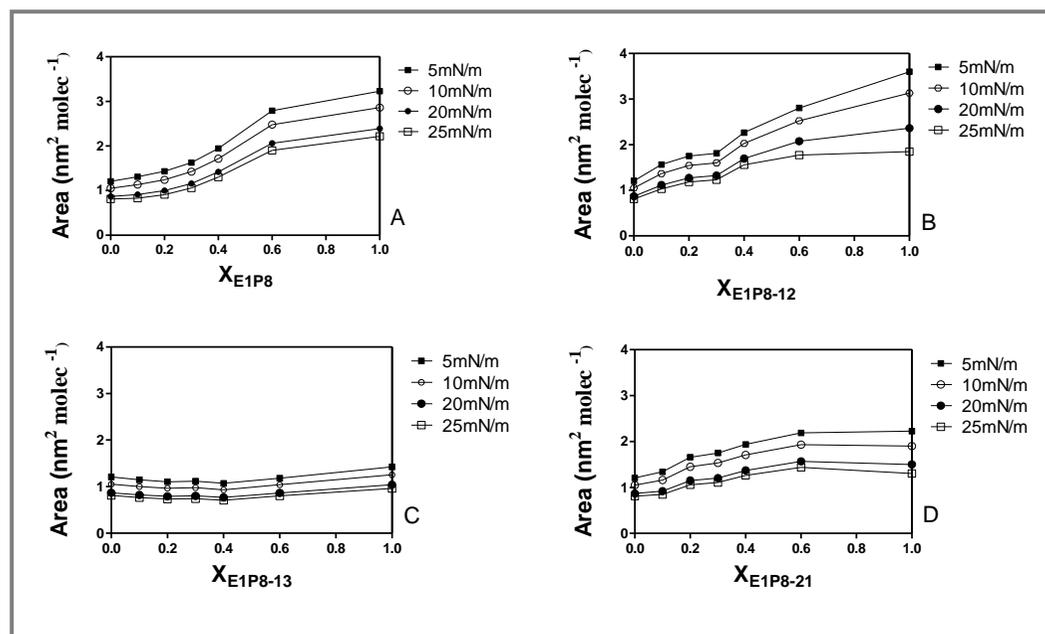


**Figura 38:** Isotermas de compresión de monocapas mixtas de POPG con (A) E1P8, (B) E1P8-12, (C) E1P8-13 y (D) E1P8-21 extendidos sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), a diferentes fracciones molares de péptidos. En el *inset* de cada gráfico se muestran los respectivos módulos de compresibilidad.

La isoterma de la película lipídica de POPG puro (línea negra) muestra un aumento continuo de la presión superficial durante toda la compresión hasta aproximadamente 42 mN m<sup>-1</sup> (Figura 38), alcanzando el máximo de módulo de compresibilidad ( $C_s^{-1}$ ) justo antes del colapso, a una presión superficial de 40 mN m<sup>-1</sup>. Los valores de éste indican que la POPG se mantiene en fase de líquido expandido a lo largo de la compresión, de acuerdo a resultados previamente publicados [193, 219].

Respecto a las mezclas lípido/péptido, a medida que aumenta la fracción molar del lípido, se observa un aumento del máximo de módulo de compresibilidad respecto a los péptidos puros. En las mezclas E1P8/POPG y E1P8-12/POPG a  $x_{E1GBV-C}=0,4$  y  $0,6$ , el máximo de  $C_s^{-1}$  se sitúa justo cuando empieza el *pseudoplateau*. En general se observa que la monocapa

lipídica es menos compresible en presencia de los péptidos que, por lo tanto, afectan el normal empaquetamiento de las moléculas lipídicas.



**Figura 39:** Variación de áreas por molécula de las isothermas mixtas de POPG con (A) E1P8, (B) E1P8-12, (C) E1P8-13 y (D) E1P8-21 extendidas sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), en función de la fracción molar de los péptidos, a las presiones superficiales de 5 mN m<sup>-1</sup>, 10 mN m<sup>-1</sup>, 20 mN m<sup>-1</sup> y 25 mN m<sup>-1</sup>.

La Figura 39 ilustra la variación del área por molécula en función de la fracción molar de péptido, a presiones constantes de 5, 10, 20 y 25 mN m<sup>-1</sup> para las diferentes mezclas lípido/péptido. Se observan pequeñas desviaciones negativas respecto a la linealidad, excepto para E1P8/POPG a  $x_{E1P8}=0,6$  y E1P8-21 a todas las fracciones molares ensayadas, donde las desviaciones son positivas. En la Tabla 13 se muestran los valores de  $G^E$ . Estos valores son bajos, menores que el producto  $RT$  indicando que las desviaciones de la idealidad observadas no son significativas.

**Tabla 13:** Energía de Gibbs de exceso ( $G^E$ ) para las mezclas de POPG con E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21, a presiones superficiales de  $5 \text{ mN m}^{-1}$  y  $25 \text{ mN m}^{-1}$ .

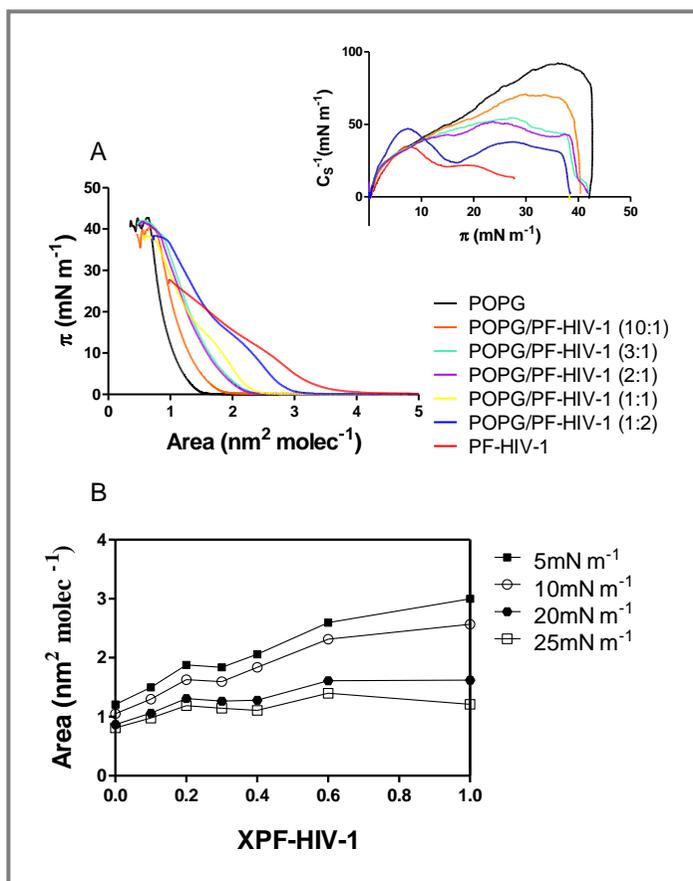
	$G^E \text{ (J mol}^{-1}\text{)}$		
	$X_{\text{E1GBV-C}}$	$5 \text{ mN m}^{-1}$	$25 \text{ mN m}^{-1}$
E1P8	0,1	666,3	960,1
	0,2	953,1	1109,6
	0,4	65,6	215,5
	0,6	-292,0	844,8
E1P8-12	0,1	137,3	-41,9
	0,2	136,1	-1016,7
	0,4	123,5	-2329,7
	0,6	13,9	-1403,4
E1P8-13	0,1	-52,3	-201,4
	0,2	-40,2	-327,5
	0,4	-411,7	-544,8
	0,6	-10,5	-386,3
E1P8-21	0,1	51,3	393,9
	0,2	5,5	791,4
	0,4	13,5	499,3
	0,6	37,7	306,6

Los estudios de miscibilidad péptido/lípido indican que la presencia de los péptidos causa una expansión de la monocapa lipídica, sugiriendo que los péptidos interactúan con la POPG, excepto en presencia del E1P8-13. Cuando se adiciona el péptido E1P8-13, las áreas por molécula de lípido no varían. Probablemente, esta diferencia es debida a una diferente disposición y orientación del péptido durante la compresión lo que le impide interactuar con el lípido. Estos resultados, junto con las desviaciones de la regla de la aditividad y las energías de Gibbs de exceso sugieren, de acuerdo con los resultados de penetración que se han descrito en los apartados anteriores, una interacción de los péptidos con el lípido POPG.

### 2.8.3 Miscibilidad PF-HIV-1/lípido en presencia de los derivados peptídicos E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21

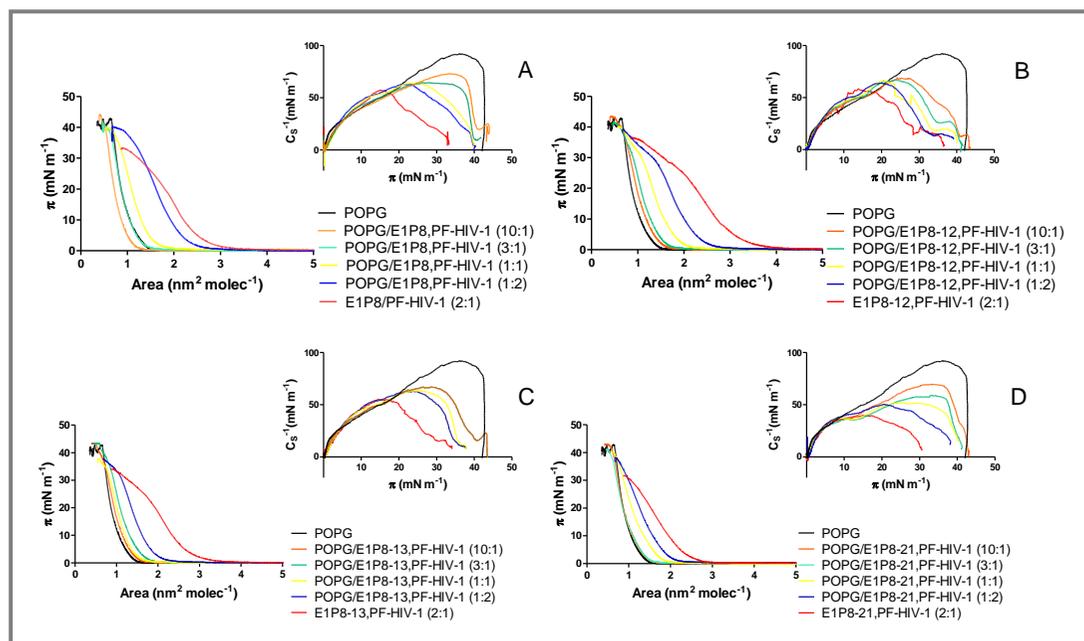
Se analizó la capacidad de E1P8 y de sus derivados de modificar la interacción del PF-HIV-1 con el lípido aniónico POPG en la formación de monocapas de Langmuir. Para ello, en primer lugar se estudió la miscibilidad del PF-HIV-1 con los lípidos POPG a diferentes fracciones molares. A continuación se escogió una mezcla del PF-HIV-1 con cada uno de los derivados E1 GBV-C en una proporción: E1 GBV/PF-HIV-1 (2:1) y se procedió al estudio de miscibilidad para comparar con los resultados obtenidos con cada uno de los péptidos por separado.

La Figura 40 muestra las isotermas de compresión que corresponden a las mezclas del PF-HIV-1 con POPG a diferentes fracciones molares. Al igual que en el caso de los derivados de la proteína E1 GBV-C, la presencia de PF-HIV-1 incrementa los valores de área por molécula al aumentar la concentración de péptido. La expansión va acompañada de un aumento de la compresibilidad de la monocapa (*inset*, Figura 40 A). Mediante el análisis de la regla de aditividad, se observan desviaciones positivas (Figura 40 B) poco significativas al igual que los de la energía de Gibbs de exceso (Anexo 2).



**Figura 40:** (A) Isotermas de compresión de monocapas mixtas del PF-HIV-1 y POPG, a diferentes fracciones molares. En el *inset* de cada gráfico se muestran los respectivos módulos de compresibilidad. (B) Variación del área por molécula de las mezclas de POPG con PF-HIV-1 extendidas sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), en función de la fracción molar del PF-HIV-1, a las presiones superficiales de 5 mN m<sup>-1</sup>, 10 mN m<sup>-1</sup>, 20 mN m<sup>-1</sup> y 25 mN m<sup>-1</sup>.

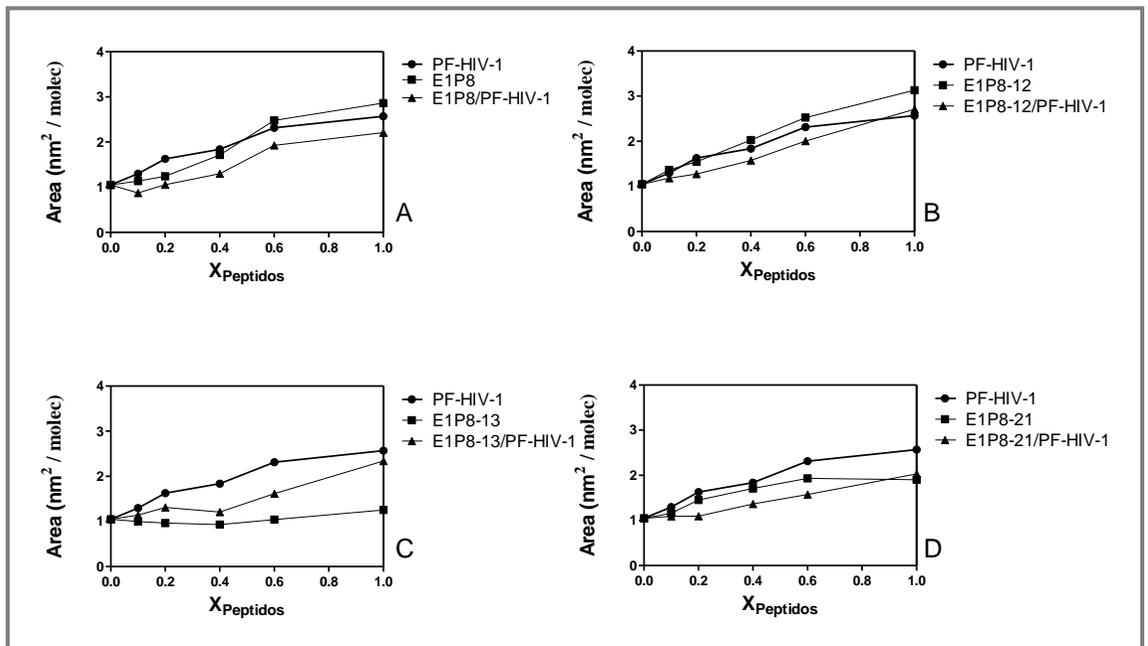
La Figura 41 muestra los resultados de las isotermas de compresión con las diferentes mezclas (POPG/ (E1 GBV-C + PF-HIV-1)). Se observa que la forma de las isotermas mixtas de POPG/PF-HIV-1 cambia cuando se añaden los derivados de la glicoproteína E1GBV-C. En presencia de los péptidos se forman películas más comprimidas que la mezcla de POPG/PF-HIV-1, acercándose a los valores de área por molécula del lípido puro.



**Figura 41:** Isotermas de compresión de monocapas mixtas de POPG con (A) E1P8/PF-HIV-1 (2,1), (B) E1P8-12/PF-HIV-1 (2,1), (C) E1P8-13/PF-HIV-1 (2,1) y (D) E1P8-21/PF-HIV-1 (2:1) extendidas sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), a diferentes fracciones molares de péptidos. En el *inset* los respectivos módulos de compresibilidad.

Mediante el análisis de la regla de aditividad, se puede observar una interacción mutua entre el lípido y la mezcla de péptidos. La Figura 42 muestra el gráfico del área per molécula en función de la fracción molar de la mezcla de péptidos, a la presión superficial de  $10 \text{ mN m}^{-1}$ , para E1P8 (A), E1P8-12 (B), E1P8-13 (C) y E1P8-21 (D). En cada figura se pueden comparar las áreas por molécula de las mezclas PF-HIV-1/POPG, E1 GBV-C/POPG y PF-HIV-1/E1 GBV-C/POPG. Como se ha descrito antes, la mezcla PF-HIV-1/POPG muestra pequeñas desviaciones positivas con un máximo a  $x_{\text{PF-HIV-1}}=0,2$  y  $0,6$ , indicando la existencia de una débil interacción repulsiva entre POPG y PF-HIV-1 a presiones superficiales bajas. En el caso de los péptidos E1P8, E1P8-12 y E1P8-21, como se indicaba en el párrafo anterior, para  $x_{\text{E1GBV-C}}$  comprendidos entre  $0,2$  y  $0,6$ , los valores experimentales indican desviaciones positivas aunque menores que para el PF-HIV-1. Mientras para  $x_{\text{E1GBV-C}} < 0,2$

y  $x_{E1GBV-C} > 0,6$  el comportamiento resulta prácticamente ideal. E1P8-13 sigue la regla de aditividad, como se puede ver en la Figura 42 C. Cuando se mezcla el POPG con E1P8/PF-HIV-1 (relación molar E1 GBV-C: PF-HIV-1, 2:1) se observan pequeñas desviaciones negativas entre  $x_{E1P8/PF-HIV-1} = 0,1$  y  $0,4$ , siendo positivas por las fracciones  $x_{E1P8/PF-HIV-1} > 0,4$ . Para las mezclas E1P8-12/PF-HIV-1 y E1P8-21/PF-HIV-1 se observa un comportamiento ideal. Finalmente, en la mezcla E1P8-13/PF-HIV-1 se observan desviaciones negativas a  $x_{E1P8-13/PF-HIV-1} = 0,4$  y  $0,6$ .

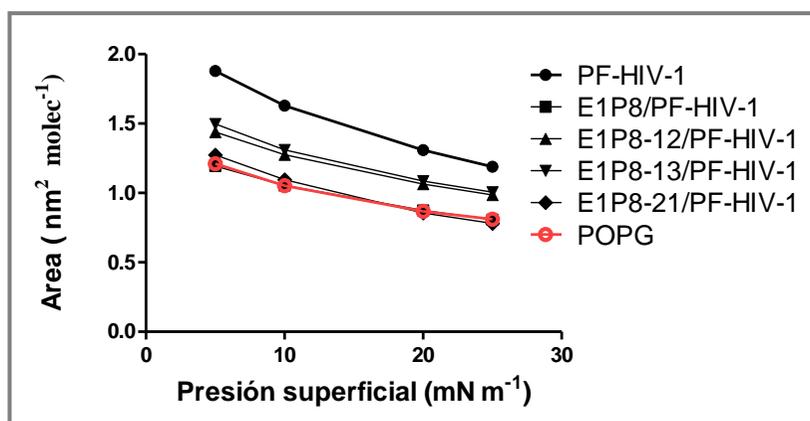


**Figura 42:** Variación del área por molécula de la mezcla de POPG con PF-HIV-1, E1P8 y E1P8/PF-HIV-1 (A), E1P8-12 y E1P8-12/PF-HIV-1 (B), E1P8-13 y E1P8-13/PF-HIV-1 (C) y E1P8-21 y E1P8-21/PF-HIV-1 (D) a la presión superficial de  $10 \text{ mN m}^{-1}$ .

Aunque las desviaciones de la regla de la aditividad resultaron no significativas en presencia de las mezclas E1 GBV-C/PF-HIV-1 (Tabla en Anexo 2), resultó interesante profundizar en el análisis de la desviación a la fracción molar  $0,2$  para el PF-HIV-1 y para (E1 GVB-C + PF-HIV-1) en mezclas con POPG puesto que se observa que, a estas proporciones, la

mezcla de péptidos recupera el valor del área por molécula del lípido puro. Los resultados se muestran en la Figura 43 donde se representa el área por molécula en función de la presión superficial para la fracción molar 0,2 del PF-HIV-1 y de E1 GBV-C/PF-HIV-1. El PF-HIV-1 produce una expansión en la monocapa de POPG indicando interacción entre ellos, de acuerdo también con los resultados de liberación del contenido vesicular. Cuando se adiciona al PF-HIV-1/POPG los derivados E1P8-12 y E1P8-13 las áreas por molécula se reducen, mientras cuando se añaden los péptidos E1P8 y E1P8-21, las isothermas recuperaron la forma y las áreas de POPG puro, es decir se anula el efecto producido por el PF-HIV-1, E1P8 y E1P8-21 sobre las monocapas del lípido.

Por lo tanto, los resultados muestran que el PF-HIV-1 y los derivados de la proteína E1 GBV-C interactúan entre ellos, influenciándose en la manera de interaccionar con el lípido POPG.

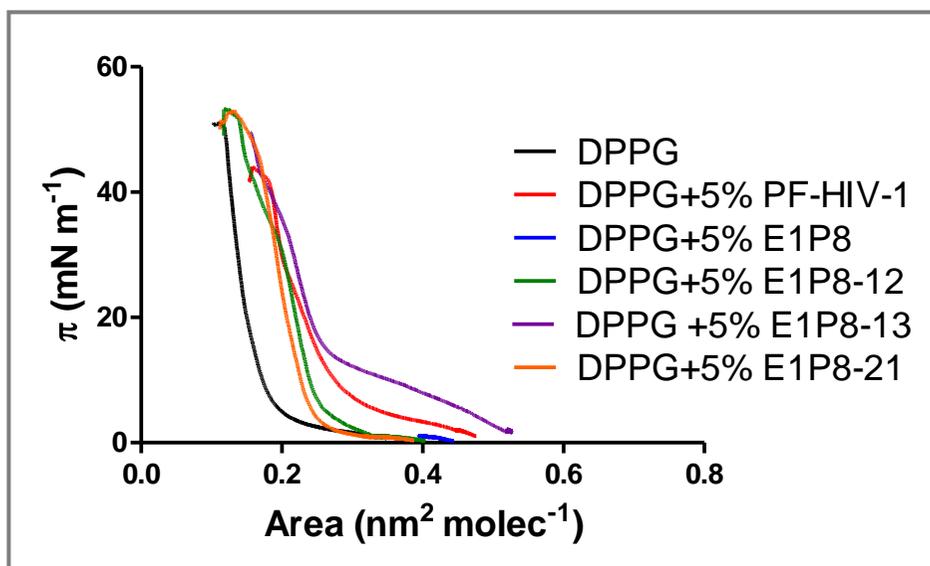


**Figura 43:** Incrementos de las áreas por molécula en función de la presión superficial de las monocapas POPG con E1P8/PF-HIV-1 (2,1), E1P8-12/PF-HIV-1 (2,1), E1P8-13/PF-HIV-1 (2,1) y E1P8-21/PF-HIV-1 (2,1) extendidas sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), a la fracción molar de péptidos 0,2.

### 2.8.4 Interacción péptido/lípido por microscopía de fluorescencia

Los estudios de microscopía de fluorescencia se llevaron a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Biología de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección del Dr A. Cruz, gracias a la colaboración existente entre el grupo del Dr A. Cruz y el USIBAP.

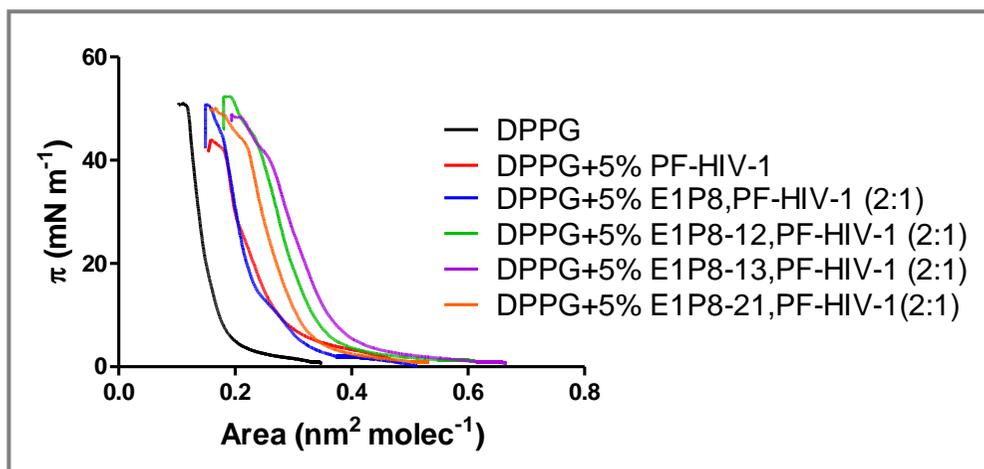
Para analizar el efecto de los péptidos sobre la estructura de monocapas de lípidos y poder observarlas al microscopio, se prepararon películas de Langmuir-Blodgett utilizando el método COVASP (*Continuously Varying Surface Pressure*) que permite obtener una transferencia única de la monocapa a lo largo de la compresión completa [169, 220]. En este caso, se utilizó DPPG en lugar de POPG para poder observar como los péptidos modifican o interfieren en el cambio de fase de lípido.



**Figura 44:** Isothermas de compresión de las monocapas mixtas de DPPG con el 5% de PF-HIV-1, E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 extendidas sobre agua como subfase.

En la Figura 44 se muestran las isothermas de DPPG en ausencia y en presencia de 5% molar de PF-HIV-1, E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21. Todos los péptidos provocan una expansión de la isoterma de DPPG hacia valores de áreas por molécula más altas, indicando que el péptido estaba ocupando espacio en la interfase y perturbando el normal empaquetamiento de los lípidos. En presencia del PF-HIV-1, se observa un cambio en la pendiente de la isoterma alrededor de  $30 \text{ mN m}^{-1}$  respecto a la isoterma de DPPG. A presiones más bajas, aproximadamente a  $5 \text{ mN m}^{-1}$ , la forma de la isoterma muestra uno *pseudoplateau* que se podría asociar a la fase de transición líquido expandido a líquido condensado (LC-LE) [70]

El efecto de E1P8 y de sus análogos sobre las monocapas DPPG es más variable. En primer lugar, se observa un cambio en la pendiente de las isothermas a  $\sim 35 \text{ mN m}^{-1}$  en presencia de E1P8 y E1P8-12 y a más de  $45 \text{ mN m}^{-1}$  para la isoterma que contiene E1P8-21. Este cambio en la pendiente de la isoterma durante la compresión podría estar relacionada con los cambios en la orientación de los péptidos en la monocapa o incluso con exclusión parcial de los péptidos de la monocapa lipídica a presiones más altas [221, 222]. A presiones superficiales más bajas, las monocapas en presencia de E1P8, E1P8-12 y E1P8-21 presentan isothermas con un comportamiento comparable al de DPPG, parece que alteran la reorganización de las moléculas de DPPG, para la formación de dominios a lo largo de la transición de fase de LC a las fases de LE, en una menor medida que el péptido PF-HIV-1. En cambio, la isoterma de DPPG en presencia de E1P8-13 muestra un cambio aparente del *plateau* de transición de fase a presiones superficiales más altas,  $\sim 10 \text{ mN m}^{-1}$ ; indicando un mayor efecto en la reorganización de las moléculas DPPG durante la transición de fase del lípido que los otros derivados de la glicoproteína E1 GBV-C.

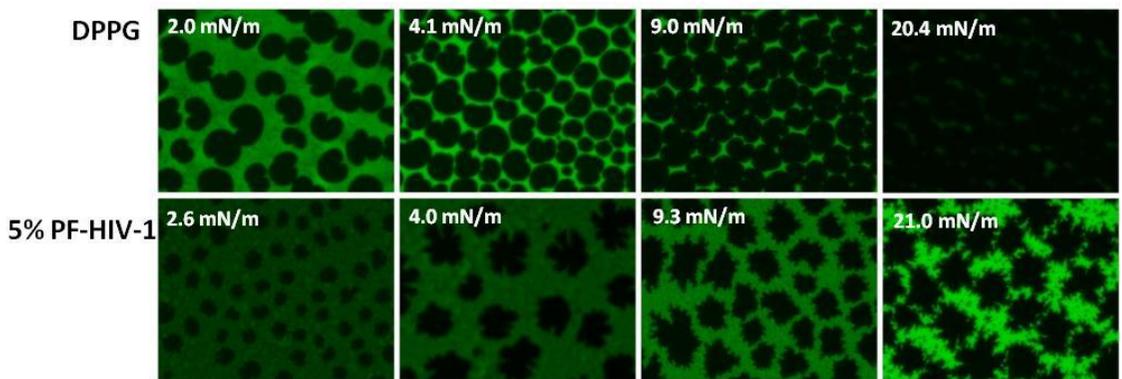


**Figura 45:** Isothermas de compresión de monocapas mixtas de DPPG con el 5% de PF del HIV-1, E1P8/PF-HIV-1 (2,1), E1P8-12/PF-HIV-1 (2,1), E1P8-13/PF-HIV-1 (2,1) y E1P8-21/PF-HIV-1 (2,1) extendidas sobre la subfase de agua.

La Figura 45 muestra las isothermas de DPPG puro y en presencia de 5% molar del PF-HIV-1 y de las diferentes mezclas de PF-HIV-1/E1P8 y derivados (1:2 molar / molar). En todos los casos, respecto a la monocapa lipídica pura, se observan isothermas más expandidas hacia áreas incluso más grandes que las observadas en presencia de la mezcla lípido/péptido. Este comportamiento probablemente puede ser debido a una interacción entre los análogos E1P8 y PF-HIV-1 que modifica la forma de los péptidos de interactuar con el lípido. Ninguna de las mezclas muestra diferencias significativas en la forma de la isoterma, a presiones de la transición de fase de DPPG, respecto al lípido solo. Incluso la mezcla DPPG/PF-HIV-1/E1P8-13 muestra una isoterma con un *plateau* similar a la de la isoterma de DPPG a presiones bajas, a pesar de que el E1P8-13 producía un aumento en la presión de la superficie donde tiene lugar la transición de fase.

Para caracterizar mejor el efecto de los péptidos sobre la transición de fase lateral del lípido de DPPG, se prepararon monocapas en presencia de 1% molar de la sonda fluorescente NBD-PC y se transfirieron a cubreobjetos de vidrio. La transición de fase (LE-LC) se puede

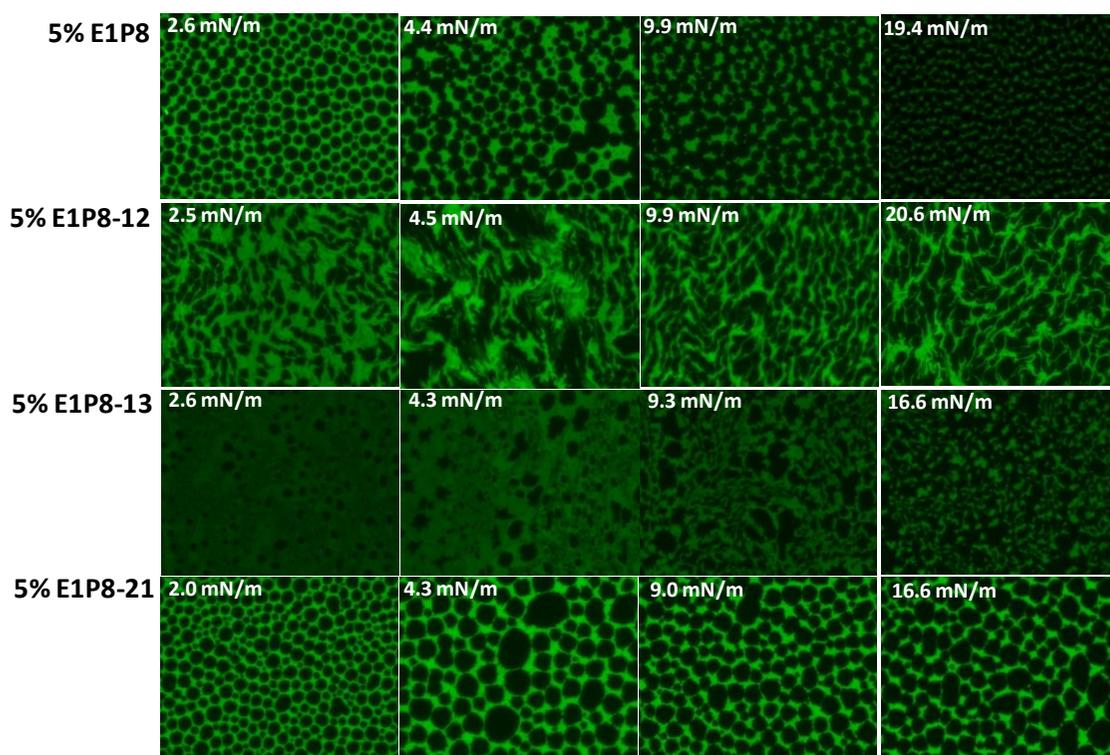
observar por microscopía de fluorescencia con la aparición de dominios oscuros de fase condensada en la interfase que excluyen la sonda fluorescente. Estos dominios condensados crecen de tamaño a medida que la transición de fase se completa, hasta cubrir casi por completo la interfase, con exclusión de la sonda fluorescente a regiones más pequeñas que rodean la fase LC. Monocapas que contienen DPPG puro, a 25°C, muestran una transición de fase de LC a LE a partir de presiones superficiales muy bajas, de menos de 1 mN m<sup>-1</sup>, y terminando por encima de 10 mN m<sup>-1</sup> (Figura 46).



**Figura 46:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de monocapas de DPPG en presencia y en ausencia de 5% FP HIV-1. Las imágenes de las películas LB transferidas durante una compresión continua fueron tomadas a las presiones superficial indicadas.

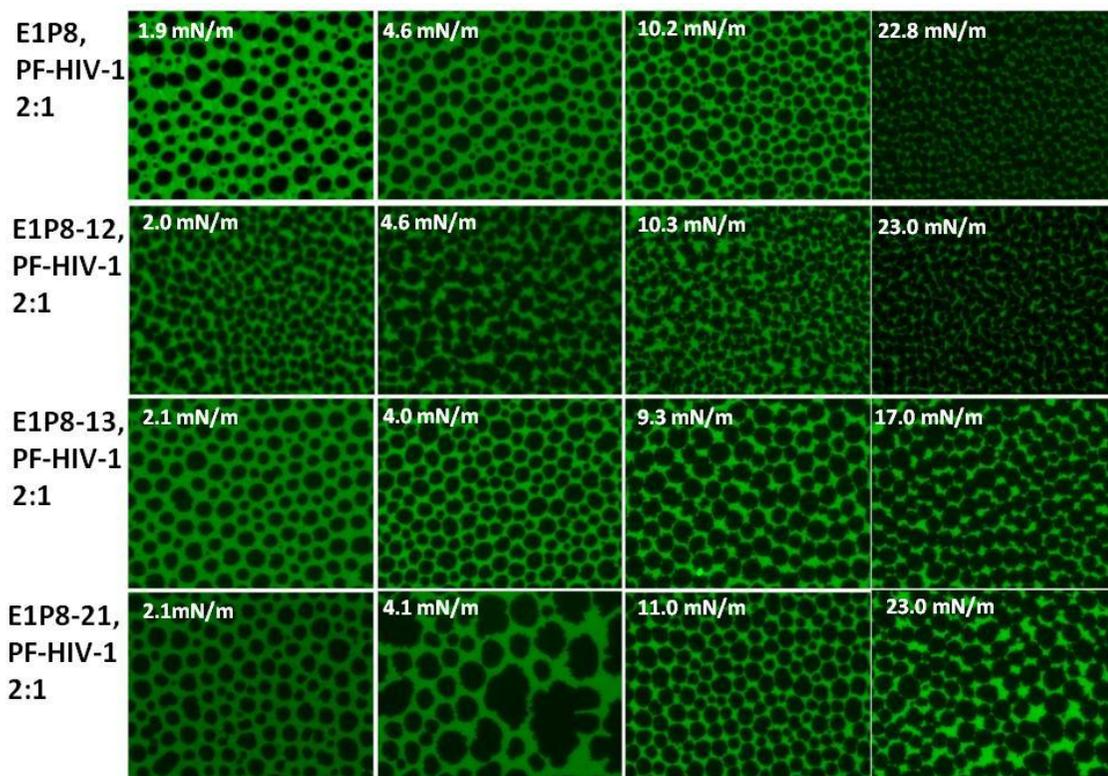
La adición del péptido PF-HIV-1 a monocapas de DPPG provoca dos efectos evidentes (Figura 46). Por un lado, PF-HIV-1 perturba la transición de fase lateral del lípido, provocando la producción de dominios menos grandes y más ramificados. Además, comparando las imágenes de DPPG y DPPG/PF-HIV-1 a presiones similares (Figura 46), se observa que la monocapa en presencia del péptido completa la transición a presiones superficiales más altas, es decir el PF-HIV-1 retrasa la condensación del lípido. Mientras que la imagen de la película de DPPG a presión superficial 20,4 mN m<sup>-1</sup> ya muestra una transición completa a líquido condensado, la imagen de la monocapa con 5% PF-HIV-1 a 21 mN m<sup>-1</sup> muestra dominios rodeados de regiones verdes bien definidas, indicando que

todavía la monocapa permanece en una fase LE. Este cambio en las monocapas de DPPG podría ser debido a que el PF-HIV-1 interactúa preferentemente con la fase expandida del lípido, evitando el normal crecimiento de los dominios LC y provocando la formación de dominios ramificados [133]. La heterogeneidad en las regiones LE observadas a presiones relativamente bajas (véase Figura 46 a  $4 \text{ mN m}^{-1}$ ) podría ser debida a una acumulación preferencial de PF-HIV-1 en esta fase. A presiones más altas (véase Figura 46 a  $21 \text{ mN m}^{-1}$ ), la presencia de dominios más pequeños en la fase LE podría ser debido a la formación de nuevas regiones LC de DPPG o incluso a la segregación lateral del péptido de la fase de LE [70].



**Figura 47:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de monocapas de DPPG en presencia de 5% E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21. Las imágenes de las películas LB transferidas durante una compresión continua fueron tomadas a las presiones superficiales indicadas.

Cuando se analiza el efecto de E1P8 y de sus péptidos derivados, se observa una influencia menor en la transición de fase de la isoterma de DPPG (Figura 47). En todos los casos, los péptidos reducen el tamaño del dominio, si se comparan con monocapas DPPG puro o incluso con monocapas DPPG que contienen el PF-HIV-1. Sin embargo, un aumento aparente en el número de dominios mantiene el promedio del empaquetamiento de la monocapa similar a lo observado en las monocapas de DPPG puro. Este comportamiento se podría explicar en términos de una interacción más superficial de estos péptidos con el lípido, que alteran la manera en que tenía lugar la transición de fase, con la producción de un mayor número de sitios de nucleación para la formación de dominios condensados, alterando el proceso general en una menor medida [168, 221, 222]. En el caso de E1P8-12, además de los efectos mencionados anteriormente, se observa un cambio significativo en la geometría de los dominios. Por otro lado, E1P8-13 también produce un efecto claro sobre el total de fase condensada a bajas presiones (véase Figura 47 en  $4,3 \text{ mN m}^{-1}$ ) que da lugar a la formación de dos niveles de verdes diferentes en la fase LE, como se ha observado con el péptido PF-HIV-1. Estas diferencias podrían explicarse en términos de una mejor interacción de estos dos péptidos, E1P8-12 y E1P8-13, con los grupos acilos de las cadenas hidrófobas de DPPG, que perturban en mayor medida que E1P8 y E1P8-21 la reorganización de los grupos acilos del fosfolípido. Sin embargo, y en contraste con el comportamiento del PF-HIV-1, el nivel de condensación en la monocapa a presiones más altas en presencia de E1P8-13 es similar al observado en presencia de E1P8. Esto indicaría que en estas presiones, donde la mayor parte del fosfolípido está en fase condensada, la presión lateral podría superar el posible efecto de la sustitución de un solo aminoácido en la secuencia de los péptidos, produciendo un comportamiento y tal vez un reordenamiento interfacial comparables para la E1P8 y sus análogos.



**Figura 48:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de monocapas de DPPG en presencia de 5% E1P8/PF-HIV-1, E1P8-12/PF-HIV-1, E1P8-13/PF-HIV-1 y E1P8-21/PF-HIV-1. Las imágenes de las películas LB transferidas durante una compresión continua fueron tomadas a las presiones superficiales indicadas.

Estos experimentos se repitieron con el PF-HIV-1 en presencia de E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 en una relación molar PF-HIV-1: E1 GBV-C (1:2). La Figura 48 muestra imágenes de microscopía del efecto producido por las diferentes mezclas en monocapas de DPPG. Sorprendentemente, el comportamiento de los cuatro péptidos es comparable para las cuatro combinaciones. Todos ellos parecen anular el efecto claro de PF-HIV-1 en la transición de fase de DPPG, y muestran dominios con formas y tamaños similares a los observados en monocapas DPPG puro. La presencia de PF-HIV-1 también altera el comportamiento de EP8-12 y E1P8-13. Cuando se añaden estos péptidos a la monocapa

junto con el PF-HIV-1, las imágenes obtenidas muestran dominios con geometría y distribución similar a DPPG puro, en contraste con las formas y la distribución observada cuando los dos péptidos se incluyen en la monocapa de DPPG.

Aunque el comportamiento observado para las diferentes combinaciones de péptidos no se puede explicar como una total exclusión de PF-HIV-1 de la monocapa, es posible que la presencia simultánea de PF-HIV-1 y los derivados de péptidos de E1P8 induzca un cambio en la forma en que PF-HIV-1 interactúa con la monocapa. Los resultados muestran que el péptido E1P8 y sus análogos parecen afectar de la misma manera y en el mismo grado la interacción PF-HIV-1/DPPG, aunque en la mezcla péptido/lípido interaccionan cada uno de ellos de manera diferente con las monocapas lipídicas.

## **2.9 Estudio de interacción de los péptidos derivados E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C con el PF-HIV-1 mediante el método de centrifugación**

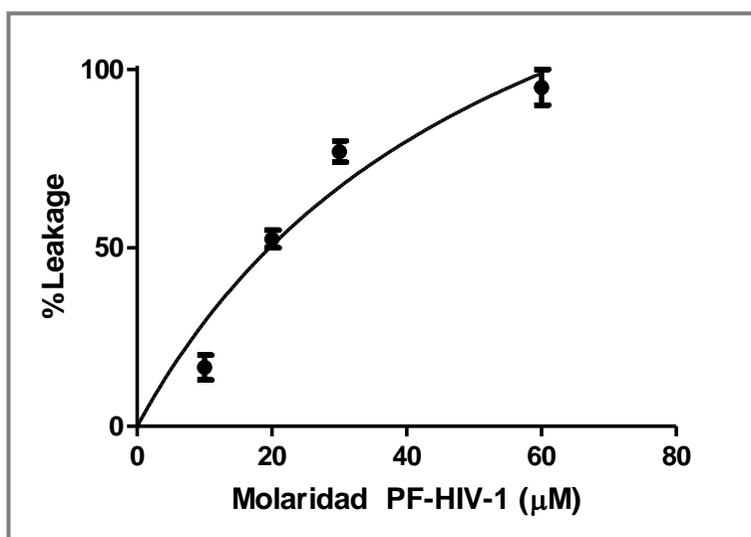
Este estudio se realizó en el Departamento de Ciencia de los Materiales de la Universidad John Hopkins en Baltimore en el grupo de la Dra K. Hristova, durante mi estancia predoctoral realizada gracias a la colaboración existente entre el grupo de la Dr K. Hristova y el USIBAP.

Con este método, en primer lugar, se cuantificó la unión del PF-HIV-1 con liposomas como modelo de membrana lipídica. Posteriormente, se analizó la capacidad del péptido E1P8 y de sus derivados E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 de inhibir la unión del PF-HIV-1 a los liposomas. El experimento consistió en la separación, mediante centrifugación, de la fracción de péptido unida a los liposomas de la parte no unida con el fin de calcular el coeficiente de partición molar del PF-HIV-1.

La dificultad de este método es que, al ser muy parecidas las densidades de los lípidos y del agua, no es sencillo sedimentar las vesículas con una centrifugación normal. Por eso se

utilizaron lípidos bromados de fosfocolina (Br-PC), que con una densidad de  $1,2 \text{ g cm}^{-3}$  precipitan con facilidad mediante centrifugación [223].

Considerando que el PF-HIV-1 se une más eficazmente con lípidos cargados negativamente [176], para asegurar la unión lípido-péptido y la sedimentación de los liposomas después de la centrifugación, se utilizó una mezcla POPG:BrPC 20:80 para el ensayo, tal y como se había publicado en otro trabajo [108].



**Figura 49:** Porcentaje de liberación de contenidos vesiculares de liposomas POPG/BrPC (20:80) inducida por el PF-HIV-1 a diferentes concentraciones de péptidos.

Se comprobó que el PF-HIV-1 interaccionaba con la mezcla POPG: Br-PC mediante el ensayo de liberación de los contenidos vesiculares. Se prepararon liposomas unilamelares de POPG:Br-PC (20:80) con ANTS y DPX encapsuladas en su interior. Se preincubó el péptido de fusión, a diferentes concentraciones molares, con los LUVs ( $0,565 \text{ mM}$ ) durante 15 minutos, y posteriormente se midió la fluorescencia emitida por la sonda ANTS ( $520 \text{ nm}$ ) antes y después la adición del PF-HIV-1. Aplicando la ecuación (4) descrita

anteriormente, como se muestra en la Figura 49, resultó que el PF-HIV-1, ya a partir de 20  $\mu\text{M}$ , provocaba más del 50% de liberación del contenido vesicular.

A continuación se incubaron los liposomas de POPG-Br-PC con los péptidos solos y con la mezcla del PF-HIV-1 y el E1P8 y sus análogos (1:1).

Antes de la centrifugación, se analizó la cantidad inicial de los péptidos por HPLC. Este valor representaba la concentración total de péptido que podía unirse a los LUVs ( $P_{\text{total}}$ ). Para cuantificar la concentración de péptido que no se unió a los liposomas ( $P_{\text{libre}}$ ) el sobrenadante obtenido después de la centrifugación se analizó por HPLC en las mismas condiciones analíticas. Cada medida se realizó por triplicado.

Se calculó el coeficiente de partición  $K_x$  siguiendo la ecuación (28):

$$k_x = \frac{[P]_{\text{tot}} - [P]_{\text{libre}}/[L]}{[P]_{\text{libre}}/[W]}$$

(28)

Donde  $[P]_{\text{total}}$  y  $[P]_{\text{libres}}$  son las concentraciones de péptido medidas, respectivamente, antes y después la centrifugación,  $[L]$  y  $[W]$  son la concentración molar del lípido y del agua [223].

El valor de coeficiente de repartición molar de la secuencia peptídica derivada E1P8-13 resultó negativo, debido a errores experimentales, por eso no se tuvo en cuenta en este ensayo.

Los resultados se muestran en la Tabla 14. El coeficiente de repartición molar correspondiente al análisis muestra que la mezcla equimolar de las secuencias E1P8-7/PF-HIV-1 y E1P8-21/PF-HIV-1 es mayor que el coeficiente de repartición obtenido al analizar los correspondientes análogos E1P8-7 y E1P8-21 solos. Respecto a la secuencia nativa E1P8, los coeficientes de repartición molares obtenidos, al analizar el péptido solo o en la

mezcla equimolares con el PF-HIV-1 son iguales. El valor de coeficiente de repartición del PF-HIV-1, en ausencia y en presencia de los derivados E1P8 no cambia significativamente.

**Tabla 14:** Coeficiente de repartición molar de los derivados de la proteína E1 y del PF-HIV-1 cuando están separados y en la mezcla equimolar de los péptidos.

	<b>Kx (E1 GBV-C)</b>	<b>Kx (PF-HIV-1)</b>
E1P8	$1,1 \times 10^5$	
E1P8+PF-HIV-1	$1,1 \times 10^5$	$6,8 \times 10^6$
E1P8-7	$2,6 \times 10^5$	
E1P8-7+PF-HIV-1	$4,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$
E1P8-12	$4,3 \times 10^5$	
E1P8-12+PF-HIV-1	$2,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$
E1P8-13	ND <sup>a</sup>	
E1P8-13+PF-HIV-1	ND	ND
E1P8-21	$1,5 \times 10^5$	
E1P8-21+PF-HIV-1	$2,3 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7$
PF-HIV-1		$3,9 \times 10^6$

<sup>a</sup> No determinado.

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que a la concentración de análogos utilizada, ningún péptido inhibe la unión de PF-HIV-1 a los LUVs.

## **2.10 Estudio de interacción de los péptidos derivados E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 del GBV-C con el PF-HIV-1 mediante dicroísmo circular (CD)**

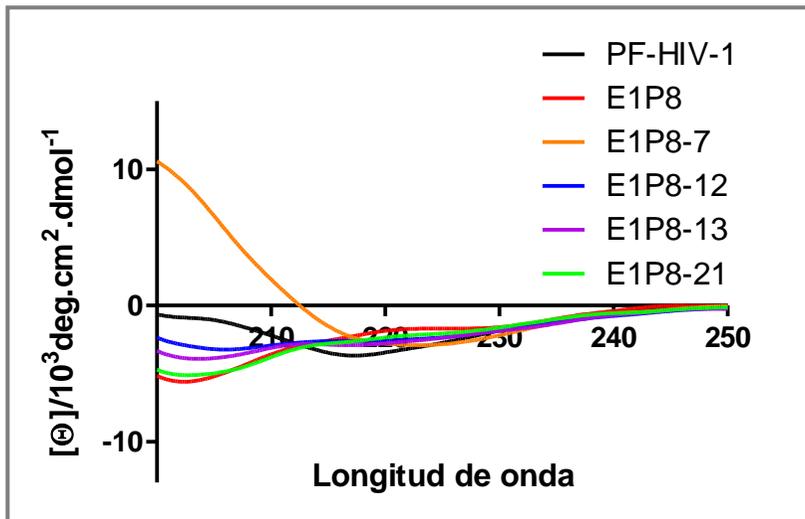
La técnica de dicroísmo circular es una técnica espectroscópica no destructiva destinada al análisis conformacional de moléculas ópticamente activas. Representa una de las técnicas más sensibles para la determinación de la conformación de las biomoléculas y la monitorización de los cambios estructurales que se producen. A pesar de que se trata de un método empírico, permite interpretar directamente los cambios en la estructura secundaria de un péptido o de una proteína.

En la presente tesis doctoral, se llevó a cabo un estudio conformacional de los péptidos mediante DC con la finalidad de analizar la capacidad del E1P8 del GBV-C y sus análogos E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 de inducir cambios conformacionales en el PF-HIV-1. Para ello se estudió, en primer lugar la estructura secundaria de los péptidos por separado en medio acuoso y, en segundo lugar, la conformación de mezclas a diferentes relaciones molares del PF-HIV-1 y los péptidos derivados del E1P8.

### **2.10.1 Estudio conformacional de los péptidos en medio acuoso**

En general, un determinado fragmento peptídico en el contexto de la estructura terciaria de una proteína adopta una estructura secundaria estabilizada por interacciones que se establecen en el mismo fragmento y por otras interacciones en las que participa el resto de la molécula nativa. En este sentido, no es extraño que un péptido no presente habitualmente una estructura secundaria muy definida en solución acuosa.

Los péptidos ensayados, al ser hidrófobos, presentaban problemas de solubilización en tampón acuoso. Para resolver este problema se disolvieron en primer lugar en 10% ACN y después se ajustó su concentración a 50  $\mu\text{M}$  en tampón de PBS 10 mM pH 7,4.



**Figura 50:** Espectro de CD obtenidos a 50  $\mu\text{M}$  de PF-HIV-1, E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21.

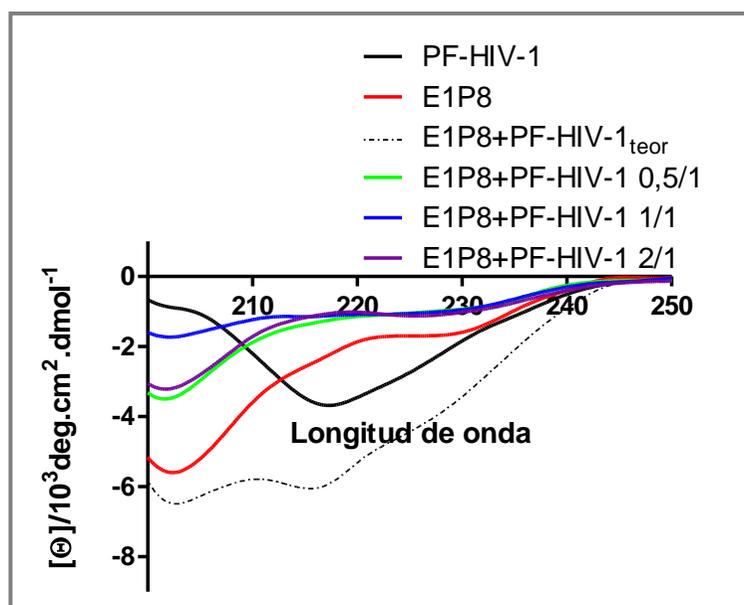
La Figura 50 muestra los espectros de DC de los péptidos en solución acuosa de PBS. El espectro de PF-HIV-1 se caracteriza por presentar una banda negativa con absorción máxima a 218 nm, la cual podría ser atribuida a una estructura de tipo  $\beta$  [101] debida, probablemente, a la tendencia del péptido a agregar en sistemas acuosos dada su naturaleza hidrofóbica.

El péptido E1P8, como ya se había analizado previamente [109], presenta un espectro con una banda negativa alrededor de 200 nm y otra muy débil sobre los 230 nm, indicativa de una conformación aperiódica o flexible, también conocida como *random coil*. Los espectros de DC de los péptidos derivados ensayados (E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21) presentaron el mismo perfil de la secuencia original. Por otro lado, el péptido E1P8-7 se caracterizó por presentar un espectro con una banda positiva a 200 nm y una negativa alrededor de 220 nm típica de una estructura de giro  $\beta$ .

### 2.10.2 Estudio conformacional de las mezclas del PF-HIV-1 y los péptidos E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21

En este ensayo se estudiaron los espectros experimental de CD de las mezclas de PF-HIV-1 con E1P8, E1P8-7, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21 a diferentes relaciones molares en medio acuoso (E1 GBV-C/PF-HIV-1; a relaciones molares 0,5:1, 1:1 y 1:2). Para ello, se preincubaron los péptidos en DMSO durante 30 minutos, se liofilizaron y se disolvieron en 10% de ACN-tampón PBS. Seguidamente, se procedió a realizar las medidas experimentales de DC.

Los espectros experimentales obtenidos de la mezcla de PF-HIV-1, E1P8 y sus análogos fueron diferentes a los teóricos obtenidos tras considerar la suma de los espectros experimentales de cada uno de los péptidos por separado.



**Figura 51:** Espectros de CD obtenidos a 50  $\mu\text{M}$  de PF-HIV-1 y E1P8, y la mezcla de los péptidos a diferentes fracciones molares del E1P8. Espectro teórico del CD calculado a partir de la suma de los espectros de cada uno por separado.

Todos los espectros teóricos (Figura 51 y Anexo 4), a excepción de la mezcla con el E1P8-7, presentan bandas negativas de intensidad parecida (una entre 200-210 nm y otra alrededor de 222 nm) que se asocian a conformaciones de tipo  $\alpha$ . El espectro teórico de la mezcla E1P8-7 y PF-HIV-1 con una banda negativa a 220 nm y una positiva a 200 nm sugiere una estructura secundaria definida de giro  $\beta$ .

Las mezclas de los derivados de E1P8 y PF-HIV-1 no muestran una estructura secundaria definida. En general, en presencia de las mezclas de los análogos E1P8/PF-HIV-1 se observa una banda negativa a 200 nm y otra menos intensa entre 220-230 nm (estructura *random coil*). La única mezcla que se comporta de manera diferente es la mezcla E1P8-21/PF-HIV-1 a la relación molar de 0,5, en donde se observan dos bandas intensas negativas una entre 200-210 nm y otra a 222 nm, que podrían indicar una conformación tipo hélice  $\alpha$ .

A partir de los espectros del DC de los péptidos y sus mezclas con el PF-HIV-1, se obtuvieron los valores de  $\alpha$ -hélice a 222 nm considerándose a partir de la ecuación (29).

$$\% \text{ helice } \alpha = \frac{[\theta_{222}]}{\left[-39500 \left(1 - \frac{2,75}{n}\right)\right]}$$

(29)

Siendo  $\theta_{222}$  la elipticidad a 222 nm,  $n$  el número de aminoácidos y 39500 la elipticidad molar por residuo que presentaría un péptido de longitud infinita totalmente helicoidal, 2,75 una constante que depende de la longitud de onda [171]. Los valores del porcentaje de hélice  $\alpha$  se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15:** Valores en porcentaje del contenido de  $\alpha$ -hélice de PF-HIV-1, E1P8, E1P8-12, E1P8-13 y E1P8-21, y de las mezclas de los péptidos derivados E1P8 y PF-HIV-1 a diferentes relaciones molares.

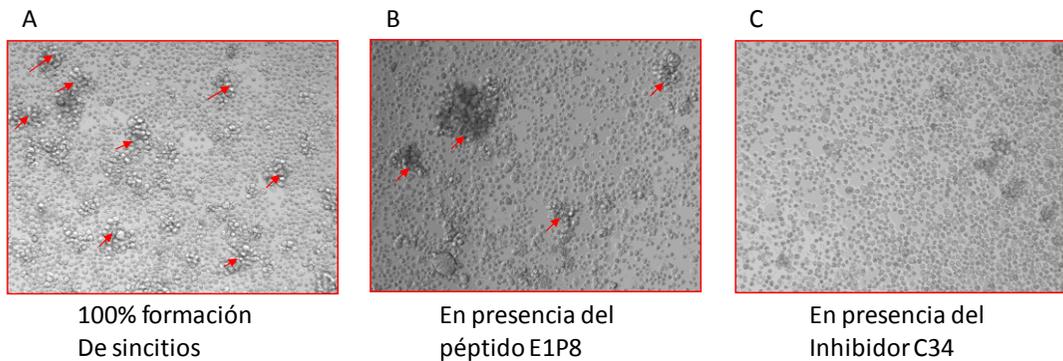
<b>Péptidos</b>	<b>Relación E1 GBV-C/PF-HIV-1</b>	<b>% <math>\alpha</math>-Hélice</b>
<b>PF-HIV-1</b>	1	11
<b>E1P8</b>	1	5,17
	0,5/1	3,0
	1/1	3,0
	2/1	2,88
<b>E1P8-7</b>	1	8,63
	0,5/1	4,9
	1/1	4,6
	2/1	3,0
<b>E1P8-12</b>	1	7,47
	0,5/1	4,48
	1/1	3,17
	2/1	3,47
<b>E1P8-13</b>	1	7,86
	0,5/1	5,48
	1/1	3,53
	2/1	3,09
<b>E1P8-21</b>	1	6,57
	0,5/1	15,20
	1/1	3,93
	2/1	4,07

Los resultados muestran que la mezcla del PF-HIV-1 y los péptidos E1P8, E1P8-7, E1P8-12 y E1P8-13 reducen el porcentaje de elipticidad a 222 nm. Por el contrario, la mezcla E1P8-21/PF-HIV-1 a la relación molar 0,5 muestra un aumento de  $\alpha$ -hélice, indicando un evidente cambio de conformación de los dos péptidos cuando se encuentran juntos. Estas variaciones de elipticidad sugieren una interacción de los análogos E1P8 con el PF-HIV-1 lo que evita la agregación del PF-HIV-1 cuando se encuentra en un medio de tampón acuoso.

### **2.11 Ensayo de fusión celular con péptidos potenciales inhibidores del PF-HIV-1 derivados de la proteína E1 del GBV-C**

Se analizó la capacidad del péptido E1P8 GBV-C y de sus 23 derivados de inhibir la fusión celular mediada por la proteína de la envoltura del HIV-1 según el procedimiento descrito en materiales y métodos. El ensayo se realizó en el Servicio de Cultivos Celulares del IQAC-CSIC de Barcelona.

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos. Como control de fusión máxima se coincubaron HeLa-env y TZM-bl en ausencia de péptidos (100% de formación de sincitios). Como control de la inhibición de la fusión celular se coincubaron las células en presencia de un inhibidor conocido de la entrada del HIV-1, el C34 [224] (240 nM), donado por el NIH (*AIDS Research and Reference Reagent Program*) y el NIAID (*Division of AIDS*). Por otro lado, se coincubaron las células en presencia de una concentración de 200  $\mu$ M de E1P8 GBV-C y de sus 23 análogos. Se llevó a cabo la valoración de la actividad  $\beta$ -galactosidasa mediante la lectura de la placa en un espectrofluorimetro SpectraMax M5, siendo la luz emitida proporcional al grado de fusión celular. En ausencia del péptido inhibidor C34 se observó la formación de grandes sincitios indicando fusión celular, mientras en presencia de C34 la fusión celular se redujo al 90% (Figura 52).



**Figura 52:** Comparación de imágenes en el ensayo de fusión celular.

En la Tabla 16 se muestran los resultados de inhibición celular de los péptidos. El péptido E1P8 muestra una inhibición de fusión celular del 80%. En el caso de los análogos, estos muestran un porcentaje de inhibición menor del 20% respecto al E1P8, por lo que los aminoácidos que se han sustituido se consideran esenciales para su actividad. De igual forma los análogos en que se ha cambiado la carga muestran una inhibición de la fusión menor que la secuencia nativa. Por el contrario los análogos en que se han sustituido los aminoácidos y/o cambiado la carga que muestran un porcentaje de inhibición igual o menor hasta el 15% que el E1P8, se consideraron como no fundamentales para la actividad del péptido, y son: E1P8-3, E1P8-5, E1P8-6, E1P8-8, E1P8-11 y E1P8-23. Para estos péptidos se ha calculado la IC<sub>50</sub>. Siendo la IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration 50*) la concentración de péptido capaz de inhibir un 50% la fusión celular. Para ellos, se coincubaron las células en presencia de concentraciones crecientes de E1P8, E1P8-3, E1P8-5, E1P8-6, E1P8-8 y E1P8-11, y se calculó la IC<sub>50</sub>, ajustando los datos a una regresión no lineal (sigmoideal-dosis respuesta) con el programa GraphPad® (V5 Prism). Como se muestra en la Tabla 16 solo los péptidos E1P8-3 y E1P8-5 presentaron una IC<sub>50</sub> inferior que el E1P8.

Los resultados indican que cada aminoácido presente en la secuencia peptídica E1P8 tiene un papel importante en la actividad del péptido. Preferentemente, los aminoácidos D y G en

posición 25 y 27 (E1P8-3 y E1P8-5) parecen no disminuir la capacidad del péptido de inhibir la fusión celular mediada por el gp41, si no que muestran una mejor actividad inhibitoria de fusión celular y una menor IC<sub>50</sub> que la secuencia *wild type* E1P8. También la carga neta negativa (2-) parece ser importante para la actividad del E1P8, ya que la eliminación de la carga negativa (E1P8-21) o la introducción de la carga positiva (E1P8-22 y E1P8-23) causa una significativa disminución de la actividad peptídica.

**Tabla 16:** Carga neta de los derivados E1P8 del GBV-C, actividad inhibitoria de los péptidos de la fusión celular mediada por la proteína gp41 y IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration 50*).

Péptido	Secuencia	Carga neta	%Inhib. Fusión (200 µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
<b>E1P8</b>	APEDIGFCLEGGCLVALG	2-	80	128,1±8,7
<b>E1P8-1</b>	A <b>A</b> EDIGFCLEGGCLVALG	2-	15	ND <sup>a</sup>
<b>E1P8-2</b>	AP <b>A</b> DIGFCLEGGCLVALG	1-	16	ND
<b>E1P8-3</b>	APE <b>A</b> IGFCLEGGCLVALG	1-	92	85,4±5,2
<b>E1P8-4</b>	APED <b>A</b> GFCLEGGCLVALG	2-	22	ND
<b>E1P8-5</b>	APEDI <b>A</b> FCLEGGCLVALG	2-	91	94,8±4,3
<b>E1P8-6</b>	APEDIG <b>A</b> CLEGGCLVALG	2-	84	140,6±6,7
<b>E1P8-7</b>	APEDIGF <b>A</b> LEGGCLVALG	2-	34	ND
<b>E1P8-8</b>	APEDIGFC <b>A</b> EGGCLVALG	2-	75	160,1±9,3
<b>E1P8-9</b>	APEDIGFCL <b>A</b> GGCLVALG	1-	22	ND
<b>E1P8-10</b>	APEDIGFCLE <b>A</b> GCLVALG	2-	48	ND
<b>E1P8-11</b>	APEDIGFCLEG <b>A</b> CLVALG	2-	61	197,2±2,2
<b>E1P8-12</b>	APEDIGFCLEGG <b>A</b> LVALG	2-	34	ND
<b>E1P8-13</b>	APEDIGFCLEGGC <b>A</b> VALG	2-	38	ND
<b>E1P8-14</b>	APEDIGFCLEGGCL <b>A</b> ALG	2-	29	ND
<b>E1P8-15</b>	APEDIGFCLEGGCLVA <b>A</b> G	2-	44	ND
<b>E1P8-16</b>	APEDIGFCLEGGCLVAL <b>A</b>	2-	38	ND

Péptido	Secuencia	Carga neta	%Inhib. Fusión (200 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>E1P8-17</b>	APQDIGFCLEGGCLVALG	1-	50	ND
<b>E1P8-18</b>	APENIGFCLEGGCLVALG	1-	37	ND
<b>E1P8-19</b>	APEDIGFCLQGGCLVALG	1-	44	ND
<b>E1P8-20</b>	APQNIIGFCLQGGCLVALG	1+	0	ND
<b>E1P8-21</b>	APRDIGFCLEGGCLVALG	0	59	ND
<b>E1P8-22</b>	APRRIGFCLEGGCLVALG	2+	27	ND
<b>E1P8-23</b>	APRRIGFCLRGGCLVALG	4+	40	ND

<sup>a</sup> ND no determinado.

C34 (240 nM) 90% inhibición de fusión célula-célula.

## 2.12 Ensayo de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos potencialmente inhibidores del PF-HIV-1 derivados de la proteína E1 del GBV-C

En este ensayo se analizó la capacidad de los análogos E1P8 de inhibir la infección de células TZM-bl por la cepa NL4-3 del virus HIV-1. El ensayo se realizó en el Servicio de enfermedades infecciosas del Hospital Clínico.

Las células TZM-bl se cultivaron en placas de 96 pocillos. Como control negativo de la infección se cultivaron las células en ausencia de péptido. Como control positivo del ensayo, se realizaron ensayos de susceptibilidad a inhibidores conocidos de la entrada del HIV-1, como el péptido C34.

Se calcularon los porcentajes de infectividad e inhibición, así como la IC<sub>50</sub> (concentración de péptido capaz de inhibir la infección en el 50% de los cultivos) de cada péptido. El cálculo de la IC<sub>50</sub> se realizó mediante regresión no lineal (sigmoideal-dosis respuesta) con el programa GraphPad<sup>®</sup> (V5 Prism).

Aunque, el péptido E1P8 inhibió la infección inducida por el HIV-1 con una IC<sub>50</sub> de 150  $\mu$ M, ningún análogo mostró inhibición de la replicación *in vitro* del HIV-1.

Por lo tanto, se puede concluir que ningún análogo del E1P8 presenta mejor actividad respecto a la secuencia original, ya que los que interaccionan con el PF-HIV-1 en los ensayos biofísicos, o que inhiben la gp41 en los ensayos de fusión celular, no presentan actividad inhibitoria de la infección *in vitro* de células TZM-bl inducida por el HIV-1. Por consiguiente, tanto la estructura primaria del péptido como su carga neta son esenciales para su capacidad inhibitoria de la entrada del virus HIV-1 en la célula huésped.

A partir de estos resultados se han planteado otras modificaciones del péptidos E1P8 como es la derivatización lipofílica del péptido o su ciclación mediante un puente disulfuro entre dos cisteínas en posiciones 29 y 34. Estos nuevos análogos se describen en el siguiente capítulo.