

Tesis Doctoral

DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTRUCTURA DE DOMINIOS  
HELICOIDALES  
INFLUENCIA DE LA INTRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS D

Carmen Giovana Granados Ramírez



Departamento de Química Orgánica  
Facultad de Química  
Universidad de Barcelona  
Barcelona, 2007

***CONCLUSIONES***



## 4. CONCLUSIONES

Se han diseñado dos péptidos heteroquirales, derivados del péptido C34 de gp41 de VIH-1, capaces de inhibir la fusión de virus, después de verificar que el enantiómero y el retro-enantiómero de este péptido son inactivos. Las modificaciones parciales por aminoácidos D en las regiones terminales de C34 se escogieron por su baja influencia en la interacción directa con el fragmento N36 de gp41, de tal forma que las cadenas laterales de dichos residuos pudieran interaccionar para formar puentes salinos con los residuos que comprenden una vuelta de hélice  $\alpha$ . Las modificaciones Glu27D-Glu y Gln31D-Lys se realizaron en el péptido M<sub>2</sub>C34. En el péptido M<sub>3</sub>C34 también se substituyó la Met2 por D-Glu y el Glu7 por Lys. Los cambios en la región C-terminal de ambos péptidos incrementaron la estabilidad frente a tripsina de los enlaces Lys28-Asn29 y D-Lys31-Glu32. Los dos análogos heteroquirales de C34 conservaron la capacidad de formar complejos estables con el fragmento N36 de gp41.

A partir del rediseño de la hélice C-terminal del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, se preparó una quimioteca OBOC de 4096 péptidos todo-D en la que se identificaron 21 péptidos capaces de formar complejos heteroquirales con el fragmento N-terminal del este dominio (H<sub>1-2</sub>). Las secuencias activas poseían en común el motivo D-Trp-D-Lys. Seis de estos péptidos se sintetizaron a mayor escala. Todos los péptidos activos mostraron tendencia conformacional a adoptar una estructura de hélice  $\alpha$  en presencia de 2,2,2-trifluoroetanol de acuerdo con observado por espectropolarimetría de dicroísmo circular. Las mezclas equimolares de los péptidos todo-D con H<sub>1-2</sub>, en tampón acuoso a pH 7.4, presentaron en general un ligero desplazamiento hacia longitudes de onda mayores, respecto al espectro obtenido de la suma aritmética de los espectros de los péptidos individuales. Esto parecía indicar una cierta estructuración y ensamblaje entre H<sub>1-2</sub> y los péptidos activos. Por otro lado, se verificó por resonancia de plasmon superficial la capacidad de estos péptidos de unirse a H<sub>1-2</sub>. De los péptidos estudiados, el péptido 2D (Ac-dpsqlnawkeawkknkadqapk-NH<sub>2</sub>) en presencia de H<sub>1-2</sub> mostró cambios en el espectro de dicroísmo circular que suscita interés en mayores estudios para caracterización del complejo heteroquiral formado.

Dos nuevos análogos del dominio B de la proteína A del *Staphylococcus aureus* se sintetizaron en fase sólida con modificaciones en los residuos Ser44 y Leu47 de la hélice C-terminal. Las consecuencias estructurales y en la actividad de las modificaciones realizadas, Ser44Phe Leu47Lys en el dominio FANK y Ser44Phe Leu47Val en el dominio FANV, se analizaron tanto para los dominios completos como para los complejos no covalentes, H<sub>1</sub>.

$2/H_3$ ,  $H_{1-2}/H_{3FANK}$  y  $H_{1-2}/H_{3FANV}$ . En primer lugar, se demostró la capacidad de los péptidos análogos de  $H_3$  de interactuar y formar complejos con el fragmento N-terminal del dominio B. La interacción péptido-péptido condujo a la formación de un complejo no covalente estructurado en hélice  $\alpha$ . Además, la presencia de estos péptidos en disolución con el fragmento  $H_{1-2}$  dio lugar a un mayor reconocimiento del fragmento cristalizable de IgG. Por otro lado, los dos dominios análogos del dominio B conservaron la capacidad de interactuar con inmunoglobulinas de conejo y humana, así como la estructura nativa del dominio natural. Los espectros RMN bidimensionales de los dominios análogos presentaron una buena dispersión y el análisis de las desviaciones de los desplazamientos químicos mostraron la presencia de tres hélices, al igual que en el sistema natural. Este análisis permitió demostrar la potencialidad de la aplicación de la estrategia combinatoria OBOC para modificar proteínas pequeñas partiendo del reconocimiento entre fragmentos peptídicos.