



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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (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) service and by the UB Digital Repository (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

3 DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS PEPTÍDICOS DE LA REGIÓN E1(22-39) DEL VIRUS GBV-C: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-HIV-1 DE NUEVAS PRESENTACIÓN PEPTÍDICA: LIPOPÉPTIDOS Y PÉPTIDO CÍCLICO

En literatura [225-230] se han descrito diferentes estrategias para mejorar la actividad de moléculas sintéticas. Así, estudios previos han demostrado que, por ejemplo, la pegilación, la glicosilación y la incorporación de albumina aumentan la estabilidad de los péptidos y mejoran su farmacocinética [228-230]. La derivatización lipofílica de un péptido es otra estrategia que se está considerando para mejorar la actividad peptídica, ya que puede aumentar su inmunogenicidad y sus propiedades farmacocinéticas, y favorecer, también, su estabilidad enzimática [231, 232]. Se ha descrito que la adición de un ácido graso a un péptido, el cual inhibe la fusión del HIV-1 a las células, aumenta su actividad inhibitoria [233]. Asimismo, se produce un aumento de la concentración de moléculas lipofílicas en aquellos puntos donde tiene lugar el proceso de fusión del HIV-1 con la célula huésped, por ello la unión de ácidos grasos a las membranas celulares puede incrementar la actividad de los derivados peptídicos.

Por otra parte, se ha descrito que un gran número de moléculas bioactivas con propiedades farmacológicas poseen una estructura cíclica [234]. Debido a su rigidez estructural, estas moléculas presentan una actividad biológica y una especificidad mayores, así como una superior estabilidad metabólica frente a la acción de las enzimas proteolíticas. Las moléculas cíclicas también presentan una mayor selectividad en su afinidad por los receptores [235]. Por esa razón, con el fin de aumentar la actividad de un péptido, en los últimos años se vienen desarrollando diferentes metodologías para la preparación de ciclos peptídicos [236, 237]. Por ejemplo se han descrito moléculas cíclicas tras la formación de un enlace peptídico (enlace lactama o puente amida) o formando puentes disulfuro, lactona, éter o tioéter [238].

En el presente trabajo, con la finalidad de mejorar la capacidad anti-HIV-1 del péptido E1P8 del virus GBV-C, se ha llevado a cabo la síntesis de nuevas formas de presentación del

mismo. Concretamente, se realizó la derivatización lipófila de la secuencia peptídica y su ciclación, mediante la formación de un puente disulfuro, con el objetivo de llevar a cabo el estudio, comparativo con su correspondiente versión lineal, de su actividad anti-HIV-1 llevando a cabo ensayos biofísicos y celulares.

3.1 Síntesis de derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C

En primer lugar, para llevar a cabo el estudio de nuevos derivados de la secuencia peptídica E1P8 en su actividad anti-HIV-1, se realizó la síntesis de la secuencia nativa. La síntesis peptídica se realizó siguiendo la estrategia Fmoc/tBu, como se ha descrito en materiales y métodos, utilizando como soporte sólido la resina Tentagel[®] Ram, y HATU y DIEA como activadores del grupo carboxilo.

3.1.1 Síntesis de péptidos lipofílicos

Una vez terminada la síntesis del péptido E1P8, antes del desanclaje, se adicionaron al extremo N-terminal de dos fracciones diferentes de peptidil-resina, ácido palmítico y mirístico, respectivamente. La derivatización lipofílica se realizó con los activadores DIPCDI/HOBt. Para las incorporaciones de los ácidos grasos se utilizaron excesos de tres veces, tanto del ácido graso como de los agentes de acoplamiento. El tiempo de acoplamiento fue aproximadamente de 24 horas. El test de la ninhidrina dio como resultado perlas amarillas en ambos casos, indicando la formación satisfactoria de los derivados Pal-E1P8 y Mir-E1P8.

A continuación, se llevó a cabo el desanclaje utilizando la mezcla TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1%). El tiempo de reacción fue de 3 horas. Se liofilizaron los péptidos resultantes utilizando una disolución de ácido acético al 10%.

Los lipopéptidos se caracterizaron por UPLC y ES-MS (Tabla 17, espectros en Anexo 5).

Tabla 17: Caracterización de los derivados lipofílicos E1P8 GBV-C mediante UPLC y ES-MS.

Péptido	Secuencia	UPLC (k') ^a	[M] ⁻ _{teor}	[M] ⁻ _{exp} ^b
Mir-E1P8	C ₁₄ H ₂₈ O ₂ -APEDIGFCLEGGCLVALG	15,13	2001,3	2000,0
Pal-E1P8	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ -APEDIGFCLEGGCLVALG	15,95	1973,0	1972,0

^a Condiciones de UPLC: (A) 10 mM de acetato de amonio en H₂O; (B) 10 mM de acetato de amonio en Metanol. Gradiente lineal de 50%B a 100%B en 16 minutos a un flujo de 0,2 ml/min. ^b Masa experimental de los péptidos obtenida por Electrospray (ES-MS).

3.2.1 Ciclación de la secuencia lineal E1P8

Una vez terminada la síntesis de la secuencia E1P8, se llevó a cabo el desanclaje utilizando la mezcla TFA/H₂O/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%. La secuencia peptídica fue caracterizada por HPLC analítico y UPLC y ES-MS.

A continuación, se cicló el péptido mediante la formación de un puente disulfuro entre las Cys en posición 29 y 34, por oxidación al aire, en un tampón de bicarbonato de amonio pH 8-9 durante 48 horas. Con el fin de favorecer las reacciones intramoleculares frente a las intermoleculares se empleó una solución de péptido con baja concentración (0.3 mg/ml). Se controló la formación del enlace disulfuro por el test de Ellman [161]. Una vez obtenido el péptido cíclico, se desaló empleando columnas Oasis[®] HLB (Waters), tal y como se ha descrito en el materiales y métodos.

A continuación, se llevó a cabo la purificación del crudo peptídico mediante HPLC a escala semipreparativa. Se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ con un gradiente de 80% a 20% de H₂O en 25 minutos, a un flujo de 3 ml/min. El péptido cíclico (E1P8 cyc) se analizó mediante las técnicas de HPLC y ES-MS

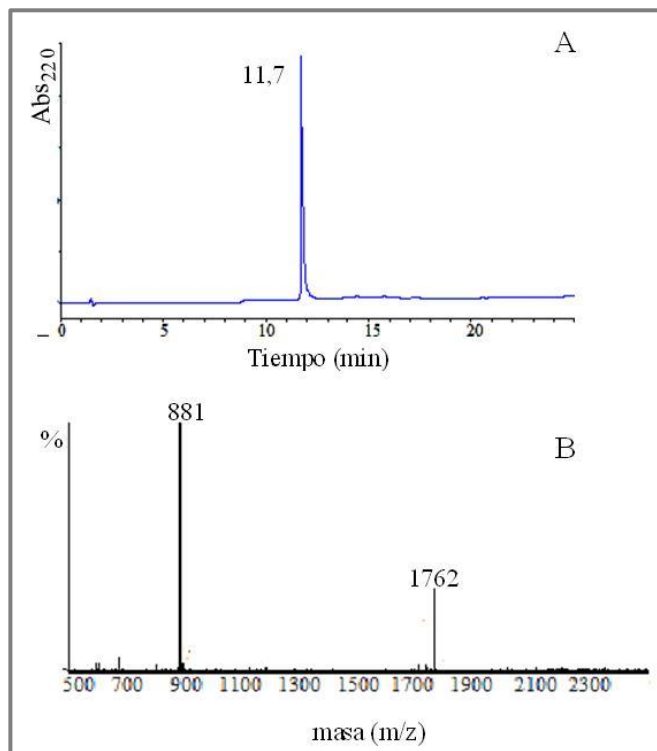


Figura 53: A) Espectro de HPLC analítico del péptido E1P8 cyc. Columna de fase reversa (Agilent) C₁₈ (4,6 x 100 mm) 3,5 μ m, gradiente lineal de A 95% a 5% en 25 minutos (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA), a un flujo de 1 ml/min, detección 220 nm. B) Espectro de masas por Electropray (ES-MS) del péptido purificado: masa calculada = 1762,04; masa experimental = 1762.

En la Figura 53 se puede observar que la purificación cromatográfica fue efectiva obteniéndose un porcentaje de pureza superior al 95%.

3.2 Síntesis del péptido de fusión del *Measles Virus* y de la secuencia peptídica VIR-576

Se llevó a cabo la síntesis en fase sólida del péptido de fusión del *Measles Virus* (PF-MLV) y el VIR-576, que se utilizaron en los ensayos biofísicos como péptidos de referencia, para comprobar la especificidad de la interacción entre el péptido E1P8 cyc del virus GBV-C y el PF-HIV-1.

El PF-MLV es la región del extremo amino terminal de la subunidad F1 de la proteína de fusión de membrana del virus del sarampión (*measles virus*), cuya secuencia es FAGVVLAGAALGVAAAAQI.

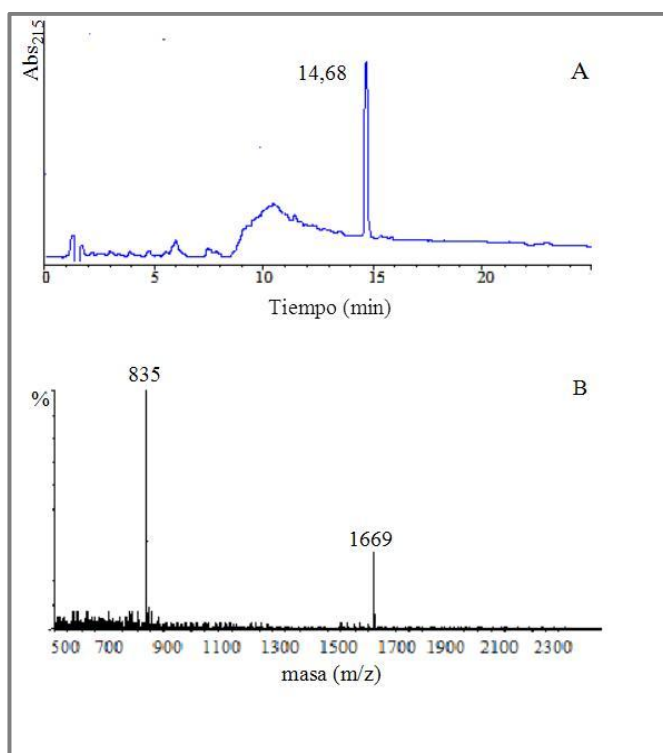


Figura 54: A) Espectro de HPLC analítico del PF-MLV. Columna de fase reversa (Agilent) C₁₈ (4,6 x 100 mm) 3,5 μ m, gradiente lineal de A 95% a 5% en 25 minutos (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA), a un flujo de 1 ml/min, detección 220 nm. B) Espectro de masas por Electropray (ES-MS) del péptido: masa calculada = 1669,98; masa experimental = 1669.

El PF-MLV se sintetizó de forma manual en fase sólida utilizando la resina PAL-ChemMatrix con una funcionalidad inicial de 0,4 mmol/g, siguiendo la estrategia Fmoc/tBu. Se emplearon como activadores del grupo carboxilo la HATU y la DIEA. Para las incorporaciones de los aminoácidos se utilizaron excesos de tres veces tanto del aminoácido protegido como de los agentes de acoplamiento. Una vez finalizada la síntesis de las

secuencias peptídicas, se procedió al secado de la peptidil-resina. El desanclaje se llevó a cabo utilizando la mezcla TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5%). El tiempo de reacción fue de 3 horas. El péptido resultante se liofilizó utilizando una disolución de ácido acético al 10%. El crudo peptídico se caracterizó mediante HPLC analítico. Asimismo, se realizó el análisis por UPLC, ES-MS y MALDI-TOF para confirmar que la secuencia peptídica sintetizada correspondía con la esperada (Figura 54). Posteriormente se llevó a cabo la desalación del péptido mediante columnas Oasis[®] HLB (Waters) tal y como se ha descrito en materiales y métodos.

El péptido VIR-576 (VIR), LEAIPCSIPPEFLFGKPFVF, es un péptido derivado del VIRIP (VIRUS-INHIBITORY-PEPTIDE) correspondiente a la región carboxiterminal de la α 1-antitripsina, una glicoproteína humana inhibidora de las serín-proteasas. En la actualidad, esta secuencia peptídica es de gran interés para el desarrollo de fármacos y terapias contra el virus del HIV-1. El péptido [C⁶, P¹²]VIRIP (VIR) es activo contra una amplia variedad de variantes del HIV-1 y parece que interacciona con el PF-HIV-1 [95]

La síntesis del VIR se realizó de forma manual en fase sólida utilizando la resina hidroxilo NovaSyn TGA con una funcionalidad inicial 0,26 mmol/g. La incorporación del primer aminoácido se efectuó tras la formación del anhídrido simétrico del aminoácido (Fmoc- Phe protegido en su extremo α -amino y cadena lateral) en presencia de DMAP (4-dimetilaminopiridina). La cantidad de aminoácido unido a la resina se determinó espectrofotométricamente, aprovechando el carácter cromóforo del aducto N-fluorenilmetilpiperidina que se obtiene al liberar el grupo Fmoc con piperidina/DMF.

El resto de la síntesis se realizó siguiendo la estrategia Fmoc/tBu, utilizando 3 equivalentes de aminoácido protegido y de agentes de condensación (DIEA y HATU) disueltos en DMF. Una vez finalizada la síntesis, se desancló el péptido de la peptidil-resina utilizando la mezcla TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2,5:2,5:1%). El tiempo de reacción fue de 3 horas. El péptido resultante se liofilizó una vez disuelto en ácido acético al 10%.

La secuencia peptídica fue caracterizada por HPLC analítico, UPLC, ES-MS y MALDI-TOF.

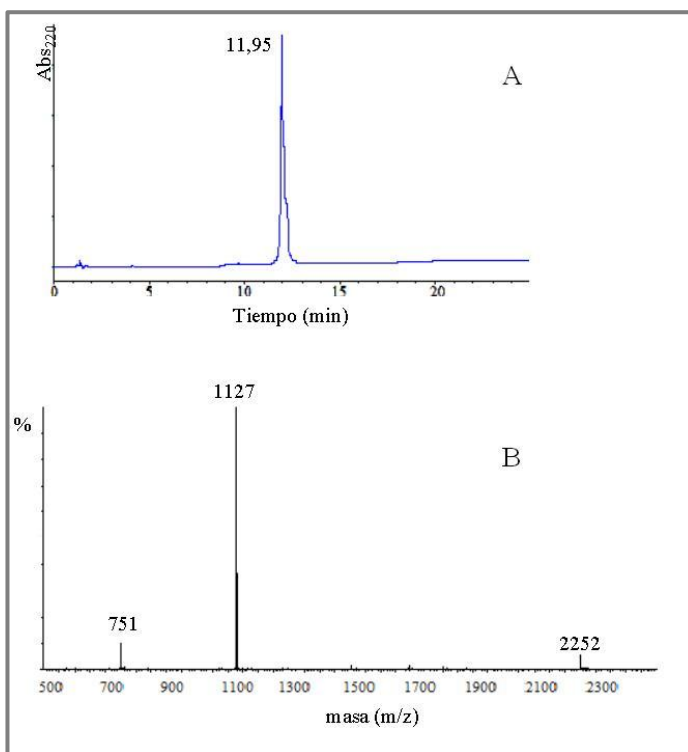


Figura 55: A) Espectro de HPLC analítico del VIR. Columna de fase reversa (Agilent) C₁₈ (4,6 x 100 mm) 3,5 μ m, gradiente lineal de A 95% a 5% en 25 minutos (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA), a un flujo de 1 ml/min, detección 220 nm. B) Espectro de masas obtenido por ES-MS del péptido purificado: masa calculada = 2251,71; masa experimental = 2252.

A continuación se llevó a cabo la purificación del crudo peptídico mediante HPLC a escala semipreparativa. Se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ con un gradiente de 80% a 20% de H₂O en 25 minutos, a un flujo de 3 ml/min. Se colectaron las diferentes fracciones con perfil cromatográfico semejante y se analizaron mediante las técnicas de HPLC y ES-MS. En la Figura 55 se puede observar que la purificación cromatográfica del péptido fue efectiva obteniéndose un porcentaje de pureza mayor del 95%.

3.3 Estudio biofísico preliminar de los derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C mediante el ensayo del *leakage*

Se realizó un estudio preliminar de la capacidad del Mir-E1P8, Pal-E1P8 y E1P8 cyc de inhibir la capacidad del PF-HIV-1 de liberar el contenido vesicular de liposomas de POPG.

En primer lugar, se prepararon LUVs de POPG que contenían en su interior las sondas ANTS/DPX, tal y como se ha descrito en materiales y métodos. El tamaño de los liposomas, que se determinó mediante espectroscopía de correlación fotónica (PCS), fue de $99,16 \pm 1,47$ nm con un índice de polidispersión de $0,086 \pm 0,015$.

A continuación, se estudió la capacidad de los péptidos derivados del E1P8 de permeabilizar las membranas lipídicas de POPG y se buscó la concentración del PF-HIV-1 que provocara aproximadamente un 50% de liberación del contenido vesicular. Todos los ensayos se realizaron a una temperatura de 25 °C.

Los resultados (Figura 56) muestran que los lipopéptidos (Pal-E1P8 y Mir-E1P8) rompían los liposomas de POPG provocando una liberación, respectivamente, del 30% y 25 % del contenido vesicular. Por otro lado, tanto el E1P8 cyc como la secuencia nativa, no desestabilizaban las membranas lipídicas. Por lo tanto los lipopéptidos, a diferencia de la secuencia original, presentan la capacidad de unirse a las membranas lipídicas y a su vez provocar la liberación del contenido vesicular, es decir la adición de los ácidos grasos modificó la actividad biofísica del péptido.

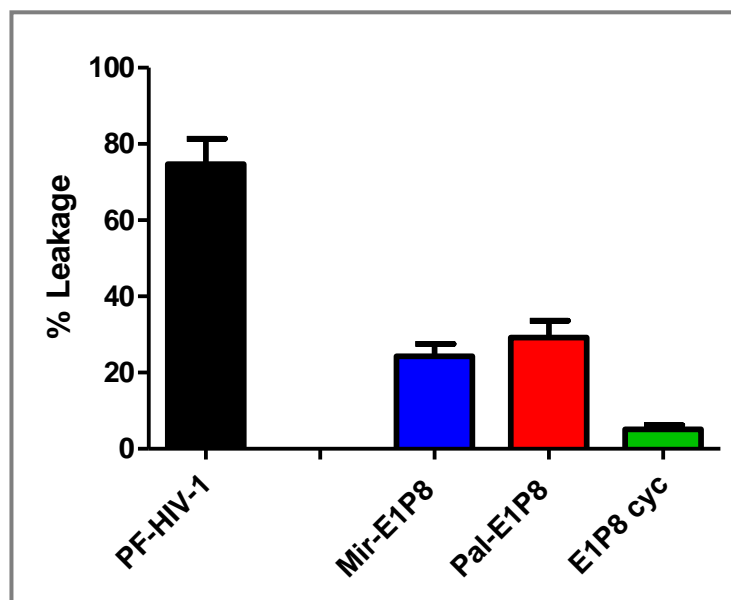


Figura 56: Porcentaje de liberación de contenido vesicular de LUVs de POPG inducido por PF-HIV-1, Mir-E1P8, Palm-E1P8 y E1P8 cyc.

Seguidamente, se preincubó, durante 30 minutos en DMSO, el PF-HIV-1 con el Mir-E1P8, Pal-E1P8 y E1P8 cyc, a una relación PF-HIV-1:E1P8 (a la relación 1:10).

De esta forma se midió la capacidad de los derivados del péptido E1P8 de inhibir la desestabilización de membranas inducida por el PF-HIV-1.

Como se ha descrito en el capítulo precedente, la secuencia nativa (E1P8) a la relación 1:10 (PF-HIV-1:E1P8) no inhibía la capacidad del PF-HIV-1 de desestabilizar las membranas de POPG [208], mientras que, como se observa en la Figura 57, tanto los lipopéptidos, independientemente del tipo de ácido graso que contengan, como el péptido cíclico disminuían el porcentaje de liberación vesicular inducida por el PF-HIV-1, inhibiendo el 50% de la actividad del PF-HIV-1.

A partir de este estudio preliminar se pudo concluir que tanto la adición de los ácidos grasos como la formación del ciclo son estrategias químicas adecuadas para aumentar la actividad biofísica del péptido E1P8. A diferencia de la secuencia nativa, los derivados resultan capaces de inhibir la ruptura de liposomas inducida por el PF-HIV-1, en la misma medida que otros péptidos de la glicoproteína E1 [108], así como otras secuencias peptídicas derivadas de la proteína E2 del virus GBV-C [69], lo cual los convierte en posibles candidatos a inhibidores de la entrada del virus del HIV-1 en las células.

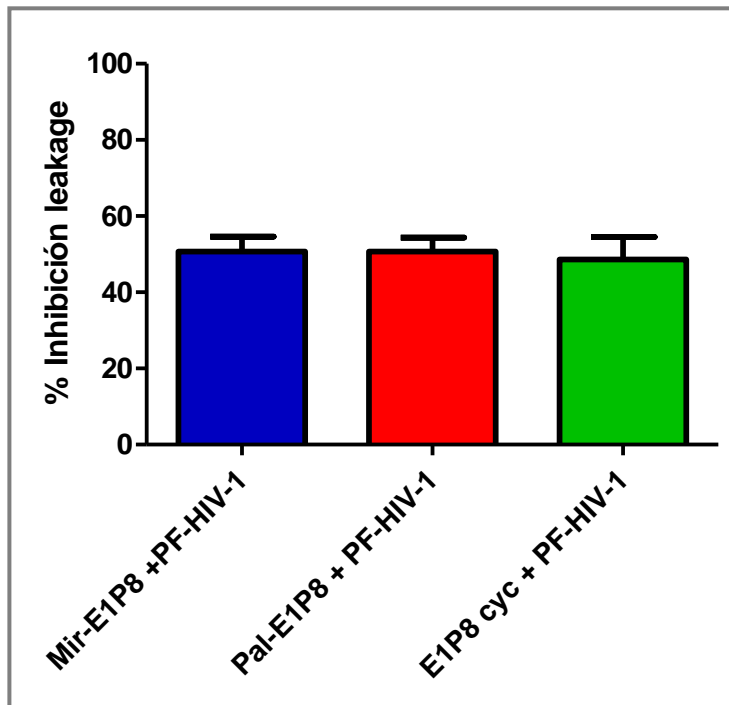


Figura 57: Porcentaje de inhibición de los lipopéptidos Mir-E1P8, Pal-E1P8 y del péptido E1P8 cyc de la liberación del contenido vesicular inducido por el PF-HIV-1.

3.4 Estudio celular de los derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C mediante el ensayo de fusión celular

Se analizó la capacidad de los derivados del péptido E1P8 de inhibir la fusión celular mediada por la proteína de envoltura del virus del HIV-1, según el procedimiento descrito en materiales y métodos. Para este ensayo se utilizaron dos líneas celulares: las células HeLa-env que expresan la proteína de envoltura gp41 del HIV-1 y las células TZM-bl que expresan el receptor de los linfocitos CD4, los correceptores CCR5 y CXCR4 y que incluían en su genoma el gen de la β -galactosidasa.

Se valoró la capacidad de los derivados peptídicos de inhibir la fusión celular, mediada por la proteína de envoltura del HIV-1, mediante la inhibición de la formación de sincitios entre las células HeLa-env y las células TZM-bl, a diferentes concentraciones de péptidos.

El ensayo se realizó por triplicado. Se coincubaron las células en presencia de Pal-E1P8, Mir-E1P8 y E1P8 cyc a diferentes concentraciones molares. Se incluyó en el ensayo el C34 [224] como control positivo, mientras las células en ausencia de péptidos (formación 100% de sincitios) representaron el control negativo.

A continuación se llevó a cabo la valoración de la activación de la β -galactosidasa mediante la medida de la fluorescencia emitida por las células en un lector de placas SpectraMax M5, siendo la luz emitida proporcional al grado de fusión celular.

Tabla 18: Actividad inhibitoria de los derivados del péptido E1P8 en la fusión celular inducida por la gp41 del virus del HIV-1.

Peptidos	% Inh. Fusión (200 μ M)	IC50 Fusión celular (μ M)
E1P8	80	128,1 \pm 8,7
Mir-E1P8	96	32,0 \pm 2,2
Pal-E1P8	94	32,4 \pm 3,3
E1P8 cyc	68	164,2 \pm 19,4

Los lipopéptidos Mir-E1P8 y Pal-E1P8 mostraron una inhibición de la fusión celular del 96 y 94% (a 200 μM) respectivamente. Esta inhibición fue mayor que la secuencia nativa, que inhibía el 80% de la fusión (Tabla 18). Mientras el péptido cíclico no mostró una mejor actividad respecto al E1P8 inhibiendo solo el 68% de la fusión.

A continuación se calculó la IC₅₀ (*Inhibitory Concentration 50*; concentración de péptido capaz de inhibir un 50% la fusión celular), ajustando los datos a una regresión no lineal con el programa GraphPad[®] (V5 Prism).

Los lipopéptidos presentaron una IC₅₀ de 32 μM , valor 4 veces inferior que el correspondiente a la secuencia lineal (128 μM). Por consiguiente, la derivatización de la secuencia peptídica con ácidos grasos mejoró la actividad inhibitoria del péptido E1P8. Por otro lado, la ciclación de la secuencia E1P8 no mejoró la actividad inhibitoria de la secuencia lineal ya que se obtuvo un valor de IC₅₀ de 164 μM .

Basándonos en este ensayo, aunque todos los derivados del E1P8 mostraron actividad inhibitoria, solo los lipopéptidos revelaron una mejor actividad respecto a la secuencia nativa. Aunque se ha correlacionado la actividad inhibitoria de los lipopéptidos con la longitud del ácido graso [233], en este caso no se observó ninguna diferencia significativa entre los derivados miristoilo y palmitoilo de la secuencia E1P8.

Paralelamente, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad de los péptidos derivados del E1P8 mediante el ensayo de MTT, según el procedimiento descrito en materiales y métodos, para descartar que el efecto observado fuera debido a un efecto toxico de los péptidos sobre la célula. Todos los péptidos resultaron no ser tóxicos a las concentraciones ensayadas.

3.5 Estudio *in vitro* de la inhibición del virus del HIV-1 inducida por los derivados del péptido E1P8 del virus GBV-C

En colaboración con Servicio de enfermedades infecciosas del Hospital Clínico, se analizó la capacidad de los péptidos derivados del E1P8 de inhibir la infección viral por el virus HIV-1, según el procedimiento descrito en materiales y métodos.

Se infectaron las células TZM-bl con el virus del HIV-1 en presencia de concentraciones crecientes de los derivados peptídicos E1P8.

Como control negativo de la infección se cultivaron las células en ausencia de péptidos, mientras que como control positivo del ensayo, se realizó el análisis de susceptibilidad de la replicación del HIV-1 en presencia de un inhibidor conocido de la entrada del virus a las células, el péptido C34.

Se calculó la IC₅₀ de los péptidos. El cálculo de la IC₅₀ se realizó mediante regresión no lineal con el programa GraphPad[®] (V5 Prism) y se obtuvo como promedio de los experimentos realizados por triplicado.

Tabla 19: IC₅₀ de los derivados E1P8 en la inhibición de la replicación del virus del HIV-1 en cultivos celulares.

Peptidos	IC₅₀ Replicación HIV-1 (μM)
E1P8	150±50
Mir-E1P8	13,5±9,2
Pal-E1P8	12±4,2
E1P8 cyc	8,7±6,0

La IC₅₀ del Pal-E1P8 resultó ser de 12 μM, del Mir-E1P8 de 13,5 μM y del E1P8 cyc de 8,7 μM, mientras la secuencia original mostró una IC₅₀ de 150 μM (Tabla 19). Por lo tanto, los resultados demostraron que la derivatización del péptido con ácidos grasos aumenta la

actividad de la molécula en casi 12 veces respecto a la secuencia nativa. Mientras que la forma cíclica ahora si mejoró la actividad anti-HIV-1 del E1P8 en aproximadamente unas 17 veces. Según este estudio, el péptido E1P8 cyc fue el derivado peptídico que presentó una mayor actividad anti-HIV-1.

Merece ser destacado que el derivado cíclico no mostró una mejor de la actividad del péptido lineal en los ensayos de fusión mediados por la glicoproteína gp41 y los receptores y correceptores de la entrada de la célula huésped; mientras que, por el contrario, aumentó en una orden de magnitud la actividad de la secuencia lineal en el ensayo de susceptibilidad del virus. Teniendo en cuenta esta divergencia de resultados, se procedió a analizar mediante el empleo de técnicas biofísicas la posible interacción del derivado cíclico con el PF-HIV-1 con el fin de tratar de establecer una correlación entre los resultados biológicos y el posible mecanismo de acción del péptido cíclico como inhibidor de la entrada del virus HIV-1.

3.6 Estudio de interacción del péptido E1P8 cyc con el PF-HIV-1 mediante el ensayo del *leakage*

Para analizar la capacidad del péptido E1P8 cyc de inhibir al PF-HIV-1 se llevó a cabo el ensayo del *leakage* utilizando liposomas como modelo de membrana, tal y como se ha explicado con anterioridad en capítulos precedentes.

En primer lugar se prepararon LUVs de POPG con las sondas ANTS y DPX encapsuladas en su interior, como se ha descrito en materiales y métodos. El tamaño de los liposomas que se determinó mediante espectroscopía de correlación fotónica (PCS), fue de $99,16 \pm 1,47$ nm con un índice de polidispersión de $0,086 \pm 0,015$. Seguidamente se buscó la concentración del PF-HIV-1 capaz de inducir un 50% de liberación del contenido vesicular, y se preincubó 30 minutos en DMSO con el péptido E1P8 cyc, a concentraciones crecientes del péptido (relación PF-HIV-1:E1P8 cyc, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40). De esta forma se

midió la capacidad del E1P8 cyc de inhibir el proceso de desestabilización de membranas inducido por el PF-HIV-1.

Como se ha descrito en el capítulo precedente, el E1P8 lineal no inhibía a la relación 1:10 (PF-HIV-1:E1P8), la capacidad del PF-HIV-1 de desestabilizar las membranas lipídicas de POPG [208]. Sin embargo, la forma cíclica del E1P8 disminuyó el porcentaje de liberación vesicular inducida por el PF-HIV-1. Esta actividad inhibitoria aumentó al incrementar la concentración de péptido cíclico hasta alcanzar un 50% de inhibición (Figura 58).

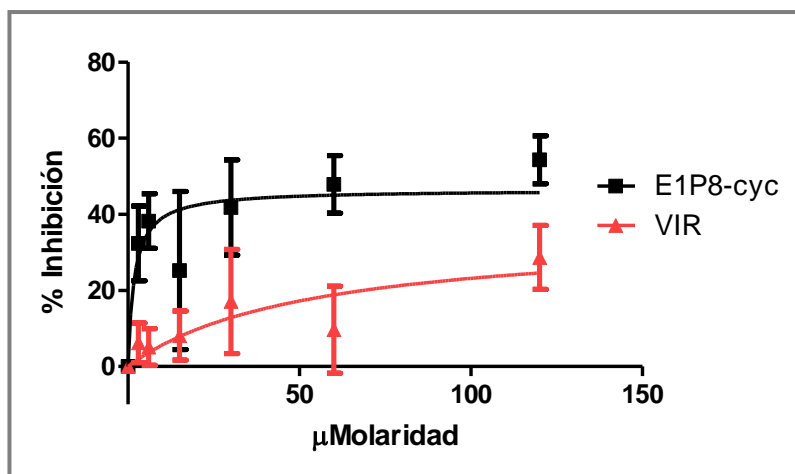


Figura 58: Efecto inhibitorio del péptido E1P8 cyc del GBV-C sobre la liberación del contenido vesicular inducida por el PF-HIV-1.

El ensayo se realizó en presencia del péptido VIR, el cual se ha sido descrito como inhibidor de entrada del HIV-1 y es capaz de interactuar con el PF-HIV-1 [95]. Se preincubaron concentraciones crecientes de VIR con el PF-HIV-1 (relación PF-HIV-1:VIR, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40) y se cuantificó la liberación del contenido vesicular de los liposomas inducido por el PF-HIV-1. El VIR inhibió la capacidad del PF-HIV-1 de desestabilizar las membranas lipídicas. Al aumentar la concentración del péptido se incrementó la actividad anti-PF-HIV-1 del VIR hasta alcanzar 30% de inhibición.

Paralelamente, se comprobó la especificidad de la interacción del PF-HIV-1 con el péptido E1P8 cyc utilizando como control del ensayo la melitina, principal toxina del veneno de las abejas. En los últimos años, la melitina se ha utilizado como péptido modelo en estudios de interacción entre péptidos y lípidos [69, 239, 240] por su capacidad de interactuar con los fosfolípidos de las membranas celulares. Se ha descrito que la melitina es capaz de inducir el 50% de la liberación del contenido vesicular de LUVs de POPG a una relación 1:10 péptido:lípido. Dado que la melitina presenta una actividad similar al PF-HIV-1 en el ensayo de liberación de contenido vesicular, en este estudio se sustituyó el PF-HIV-1 por la melitina para así comprobar la especificidad de la interacción entre el E1P8 cyc y el PF-HIV-1. Así, se preincubaron concentraciones crecientes del péptido E1P8 cyc con melitina y se cuantificó la liberación del contenido vesicular en liposomas de POPG. Los resultados demostraron que el péptido E1P8 cyc no inhibía la liberación del contenido vesicular inducido por la melitina a ninguna de las relaciones estudiadas, lo que demostró la especificidad de la interacción entre E1P8 cyc y PF-HIV-1.

Los resultados de este ensayo mostraron que, a diferencia de la secuencia nativa que no mostraba esta actividad inhibitoria [208], el E1P8 cyc inhibía la capacidad de desestabilizar las membranas lipídicas del PF-HIV-1, de manera dosis-dependiente, comportándose de la misma forma que otros péptidos pertenecientes a la proteína E2 del virus GBV-C que son capaces de inhibir la replicación *in vitro* del virus del HIV-1 [69].

3.7 Estudio de interacción del E1P8 cyc con el PF-HIV-1 mediante el ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

Se realizó un ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre el PF-HIV-1 marcado con la sonda fluorescente donadora (ácido 6-(7-Nitrobenzofurazan-4-ylamino)esanoico) NBD y el péptido E1P8 cyc marcado con la sonda aceptora Rodamina (Rho), con el fin de profundizar en los estudios de interacción entre la dos secuencias peptídicas.

La longitud de onda de la emisión máxima de la NBD es a 525-530 nm (cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico). Esta energía de emisión se solapa con la energía de excitación de la Rho: la distancia de Forster (R_o) de la pareja NBD-Rho, que es la distancia entre las sondas necesaria para alcanzar el 50% de eficiencia de transferencia de energía, es de 56 Å. Por eso, cuando las sondas NBD y Rho están en proximidad, al excitar la NBD a ~467 nm se aprecia una disminución de la emisión de la NBD a ~529 nm así como un aumento de la emisión máxima de la Rho a ~580 nm. El porcentaje de eficiencia de la transferencia de energía se determina mediante la medida de la disminución en el rendimiento cuántico del donador (NBD), como resultado de la transferencia de energía al aceptor (Rho), y depende de la distancia entre las sondas. Se calcula aplicando la ecuación (30):

$$E(\%) = \left(1 - \frac{I_{da}}{I_d}\right) \times 100$$

(30)

Siendo I_{da} la fluorescencia del donante en presencia e I_d en ausencia de la sonda aceptora.

Para realizar el ensayo, en primer lugar se derivatizaron las secuencias peptídicas correspondientes al PF-HIV-1 con NBD (NBD-PF-HIV-1) y al E1P8 cyc con la Rodamina (5(6)-Carboxi-tetrametilrodamina) (Rho) (Rho-E1P8 cyc), mediante síntesis en fase sólida tal y como se ha descrito en materiales y métodos. Los crudos peptídicos, una vez desanclados, se purificaron y caracterizaron por UPLC y ES-MS (Figura 59 y 60).

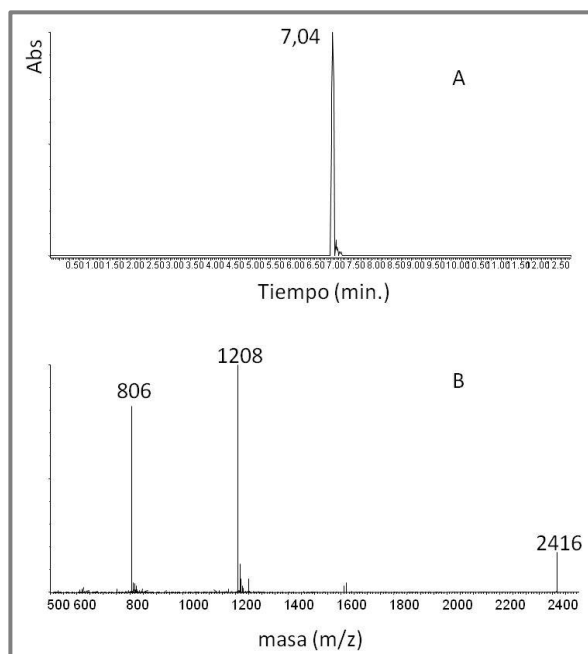


Figura 59: A) Espectro UPLC del péptido NBD-PF-HIV-1. Gradiente (A) 20 mM HCOOH en H₂O; (B) 20 mM de HCOOH en ACN. Gradiente lineal de B de 20% a 100% en 12 minutos a un flujo de 0,3 ml/min. B) Espectro de masas experimental ES-MS: masa calculada 2416,45; masa experimental 2416.

A continuación, se prepararon liposomas unilamelares de POPG, y se cuantificaron con el método descrito en materiales y métodos [162]. Mediante espectroscopía de correlación fotónica se determinó el tamaño de los liposomas a 25 °C que resultó ser de $105 \pm 0,4$ nm con un índice de polidispersión de $0,081 \pm 0,007$.

En primer lugar, se añadieron $0,4 \mu\text{M}$ de NBD-PF-HIV-1 a una solución de 1 ml de $0,1$ mM de vesículas unilamelares de POPG disueltas en PBS. Posteriormente, se adicionaron de forma secuencial concentraciones crecientes (entre $0,0125 \mu\text{M}$ y $0,4 \mu\text{M}$) de péptido Rho-E1P8 cyc (Figura 61 A). Para comprobar la validez del ensayo y la especificidad de la interacción entre el PF-HIV-1 y el E1P8 cyc, se realizó el FRET en presencia de VIR

derivatizado con Rho (Rho-VIR) y de PF-MLV derivatizado con NBD (NBD-PF-MLV). (Figura 61-B, C, D).

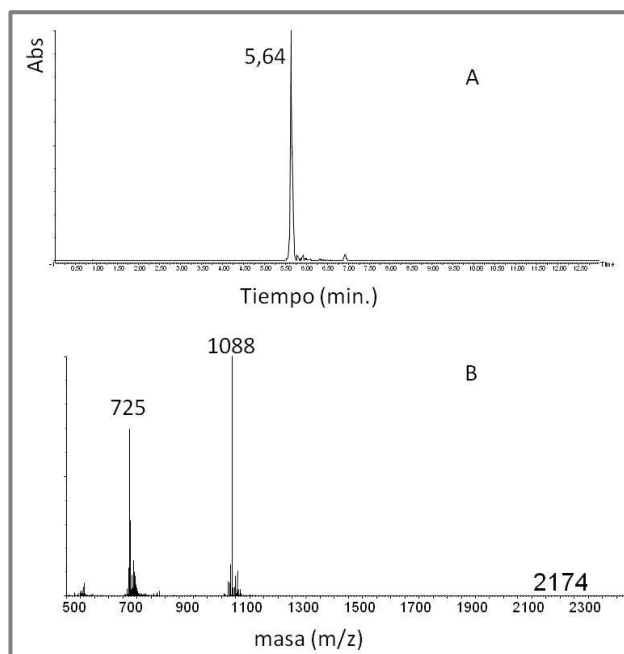


Figura 60: A) Espectro UPLC del péptido Rho-E1P8 cyc. Gradiente (A) 20 mM HCOOH en H₂O; (B) 20 mM de HCOOH en ACN. Gradiente lineal de B de 20% a 100% en 12 minutos a un flujo de 0,3 ml/min. B) Espectro de masas experimental ES-MS: masa calculada 2174,49; masa experimental 2174.

Fijada la longitud de excitación a 467 nm, como se muestra en la Figura 61 A y C, se observó que al aumentar la concentración tanto de Rho-E1P8 cyc como de Rho-VIR en la solución con NBD-PF-HIV-1 disminuía la fluorescencia emitida por la NBD (a 530 nm). Por el contrario, la adición de Rho-E1P8 cyc y de Rho-VIR a la solución con NBD-PF-MLV no causaba cambio en la fluorescencia emitida por la NBD (Figura 61 B y D)

A continuación se determinó la eficiencia de transferencia de energía (E), midiendo la disminución de la fluorescencia emitida del donador (NBD), a 530 nm, en presencia de concentraciones crecientes de Rho-E1P8 cyc aplicando la ecuación (30):

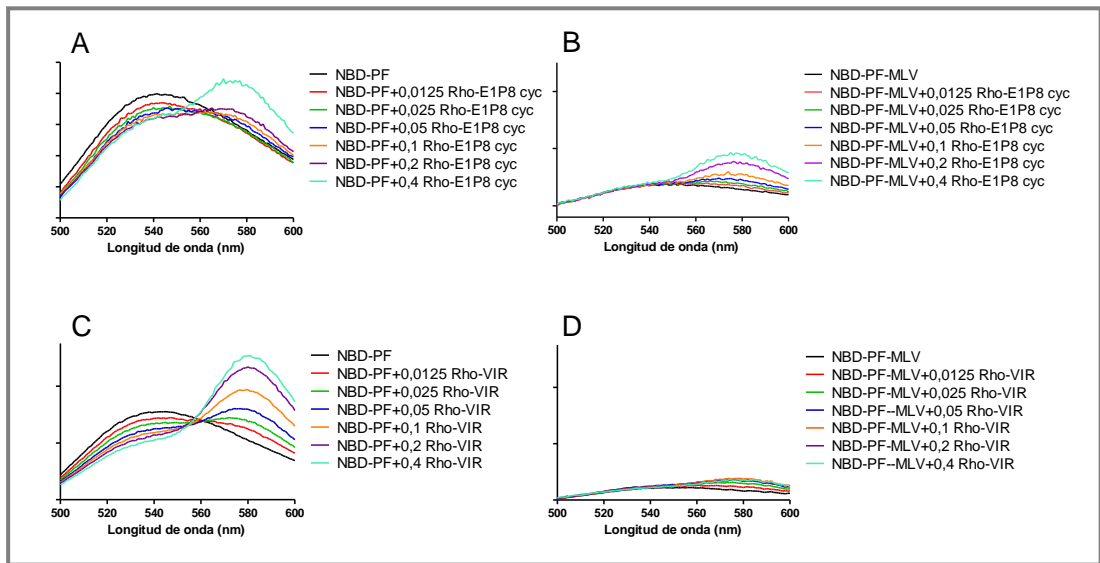


Figura 61: Fluorescencia emitida por las mezclas (A) NBD-PF-HIV-1/Rho-E1P8 cyc, (B) NBD-PF-MLV/Rho-E1P8 cyc; (C) NBD-PF-HIV-1/Rho-VIR y (D) NBD-PF-MLV/Rho-VIR. La intensidad de fluorescencia emitida por la NBD fue corregida restando la señal producida de la sonda Rho y de los liposomas.

La Figura 62 muestra el porcentaje de eficiencia de la transferencia de energía entre los péptidos NBD-PF-HIV-1/Rho-E1P8 cyc, NBD-PF-HIV-1/Rho-VIR y el NBD-PF-MLV/Rho-E1P8 cyc.

Los resultados confirman la existencia de interacción entre el PF-HIV-1 y el E1P8 cyc. De hecho, a medida que aumenta la concentración del péptido con Rho aumenta la eficiencia del FRET, indicando una asociación entre los dos péptidos. También a medida que se adicionan concentraciones crecientes del péptido control Rho-VIR se observa una disminución de la fluorescencia emitida y un aumento de la eficiencia de la transferencia de energía confirmando la validez de este ensayo, ya que es conocida la interacción de este péptido con el PF-HIV-1. Por el contrario, la fluorescencia emitida por el NBD-PF-MLV no varía en presencia de concentraciones crecientes de Rho-E1P8 cyc, lo que demuestra la especificidad de la interacción del E1P8 cyc y el PF-HIV-1.

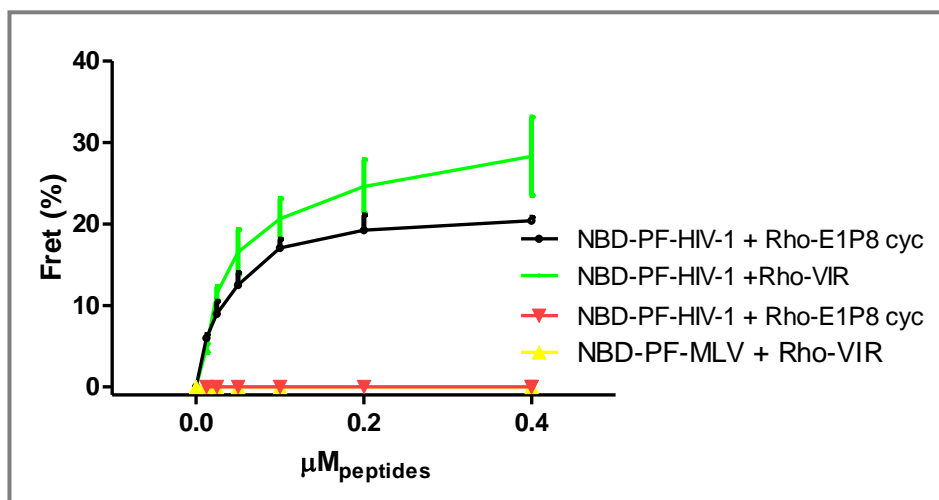


Figura 62: Porcentaje de energía de transferencia entre el NBD-PF-HIV-1 y Rho-E1P8 cyc y el control Rho-VIR a diferentes fracciones molares de péptido aceptor. Como control negativo se muestra el par NBD-PF MLV/Rho-E1P8 cyc.

3.8 Estudios de miscibilidad mediante monocapas de extensión del péptido E1P8 cyc del GBV-C y del PF-HIV-1

Se estudió la interacción del péptido E1P8 cyc del virus GBV-C con el PF-HIV-1 empleando monocapas de extensión en una balanza de Langmuir.

3.8.1 Estudio de miscibilidad péptidos/lípido

Como se ha descrito en el capítulo anterior (Figura 40), el PF-HIV-1 produce una expansión de las monocapas de POPG a medida que aumenta su fracción molar, indicando la existencia de interacción entre el péptido y el lípido, que causa una perturbación del empaquetamiento normal de las moléculas lipídicas.

En este capítulo se analizó la capacidad del péptido cíclico de modificar la interacción del PF-HIV-1 con monocapas de POPG (Figura 63). Para ello, se realizaron isotermas mixtas de compresión del E1P8 cyc y de la mezcla del péptido cíclico con el PF-HIV-1 (a una fracción

molar E1P8 cyc: PF-HIV-1, 2:1) con el fosfolípido POPG, a las mismas fracciones molares previamente ensayadas con PF-HIV-1.

El péptido E1P8 cyc, como se observa en la Figura 63 A, forma monocapas estables en la interfase aire-agua. A diferencia de la secuencia lineal, como se ha descrito en el anterior capítulo (Figura 38), el péptido cíclico muestra una isoterma más comprimida y sin formación del característico *pseudoplateau*. Probablemente debido a su mayor rigidez estructural, el E1P8 cyc asume una orientación diferente a la forma lineal en las monocapas lo que favorece el empaquetamiento de las moléculas peptídicas. La adición del péptido cíclico causa una expansión de las monocapas de POPG, indicando que el péptido ocupa espacio en la interfase interactuando con el lípido. El módulo de compresibilidad, que se calculó mediante la ecuación (25), se mantuvo en todo momento por debajo de 50 mN m^{-1} , hecho que indica que las monocapas se encuentran en estado de líquido expandido [211-213].

Del análisis del área por molécula para las diferentes fracciones molares del péptido [217] (Figura 64) y del cálculo de la energía de exceso de Gibbs (G^E) (Anexo 3) obtenida aplicando la ecuación (27), descrita en el capítulo anterior [218], se observa un comportamiento lineal de la mezcla a todas las presiones superficiales analizadas, con una desviación positiva significativa a $x_{\text{E1P8cyc}}=0,6$ a presión superficial 25 mN m^{-1} sugiriendo que a presiones altas y a elevadas concentraciones de péptido predominan las fuerzas de interacción de tipo repulsiva entre los componentes. Los valores positivos de G^E indican que el proceso de mezcla no está termodinámicamente favorecido.

Las isotermas de compresión de la mezcla PF-HIV-1, E1P8 cyc y POPG a diferentes fracciones molares de lípido (Figura 63 C), revelan (al igual que sucedía con la adición del péptido cíclico o del PF-HIV-1 por separado) que la adición de la mezcla de péptidos produce una expansión de la monocapa de lípido hacia valores más altos de área por molécula y, en consecuencia, se produce un grado de interacción a nivel de membrana.

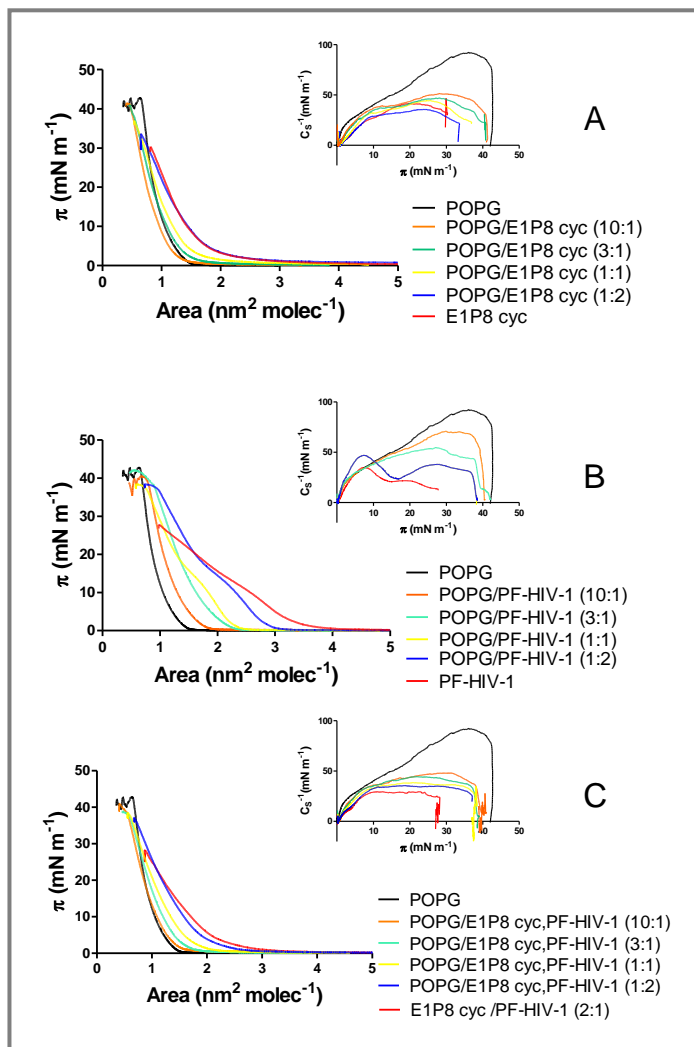


Figura 63: Isothermas de compresión de monocapas mixtas de POPG con (A) E1P8 cyc, (B) PF-HIV-1 y (C) E1P8 cyc/PF-HIV-1 (2,1) extendidas sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), a diferentes fracciones molares de péptido. En el *inset* en la parte superior, se muestran los respectivos módulos de compresibilidad.

El módulo de compresibilidad también se mantuvo por debajo de 50 mN m⁻¹, indicando que las monocapas se mantienen en fase de líquido expandido durante toda la compresión.

Cuando se analizan las isotermas obtenidas en la mezcla POPG/E1P8 cyc/PF-HIV-1 (Figura 63 A y C) se observa que son semejantes a las que presenta el lípido con el péptido cíclico.

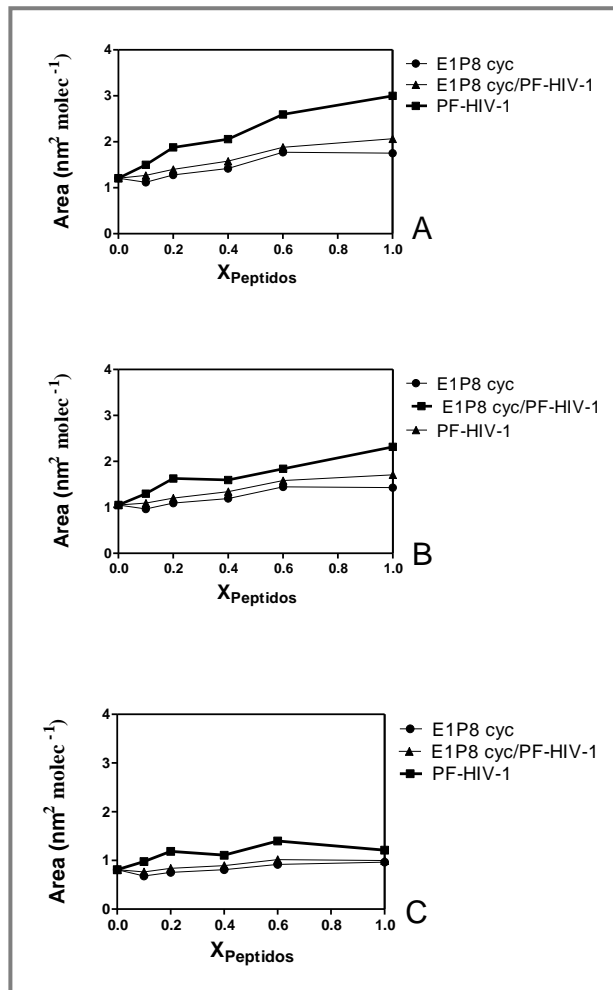


Figura 64: Variación del área por molécula de las isotermas mixtas de POPG con E1P8 cyc, PF HIV-1 y E1P8 cyc/PF-HIV-1 extendidas sobre la subfase Hepes (5 mM, pH 7,4), en función de la fracción molar de péptido, a presiones superficiales (A) 5 mN m⁻¹, (B) 10 mN m⁻¹ y (C) 25 mN m⁻¹.

La Figura 64 que muestra el área por molécula en función de la fracciones molares de E1P8 cyc, E1P8 cyc/PF-HIV-1 y PF-HIV-1 a las presiones superficiales de 5, 10 y 25 mN m⁻¹,

permite comparar las áreas a diferentes presiones superficiales entre los tres casos. Se observa que las áreas por molécula de las isothermas en presencia de la mezcla de los péptidos son menores respecto a las áreas de las isothermas en presencia del PF-HIV-1, y muy parecidas a los valores de áreas por molécula en presencia del E1P8 cyc. El efecto del E1P8 cyc sobre las monocapas de POPG parece anular el efecto del PF-HIV-1.

El mismo ensayo se llevó a cabo, como se ha descrito en el capítulo anterior, en presencia del E1P8 lineal (Figura 41 A). Se observó que en presencia de la mezcla de E1P8/PF-HIV-1 se obtenían isothermas diferentes que las obtenidas en presencia de E1P8 o de PF-HIV-1. Las mezclas E1P8/PF-HIV-1/POPG formaban monocapas más comprimidas que las mezclas E1P8/POPG o PF-HIV-1/POPG, con áreas por molécula parecidas a la de lípido puro. Sobre todo a la fracción E1P8/PF-HIV-1 0,2 se obtuvo una isoterma idéntica a la del lípido puro. Por lo tanto, se interpretó que los péptidos interactuaban entre ellos influenciándose en la manera de interactuar con el lípido. En el caso de la forma cíclica, parece que el efecto del PF-HIV-1 se anula, ya que se ve solo la influencia del E1P8 cyc.

Un comportamiento parecido a lo observado en E1P8 cyc se obtuvo en otra secuencia peptídica de la proteína E1 del virus GBV-C que se ha demostrado su interacción con el PF-HIV-1 [107]. La adición de este péptido inhibía el efecto que el PF-HIV-1 tenía sobre las monocapas lipídicas de DPPG.

3.8.2 Miscibilidad péptido/lípido: estudios de microscopía de fluorescencia

El efecto del péptido E1P8 cyc en la interacción del PF-HIV-1 con lípidos se analizó tras la observación de monocapas de Langmuir-Blodgett. En este caso, se utilizó DPPG en lugar de POPG para poder observar como los péptidos modificaban o interferían en el cambio de fase de lípido.

Las monocapas de lípidos en presencia y en ausencia del E1P8 cyc, del PF-HIV-1 y de la mezcla E1P8 cyc/PF-HIV-1 (relación molar 2:1) se comprimieron y se transfirieron a un

portaobjetos de vidrio utilizando el método COVASP (*Continuously Varying Surface Pressure*) [169, 220], que permite obtener una transferencia única de la monocapa a lo largo de la compresión completa. Las monocapas transferidas se observaron por microscopía de epifluorescencia.

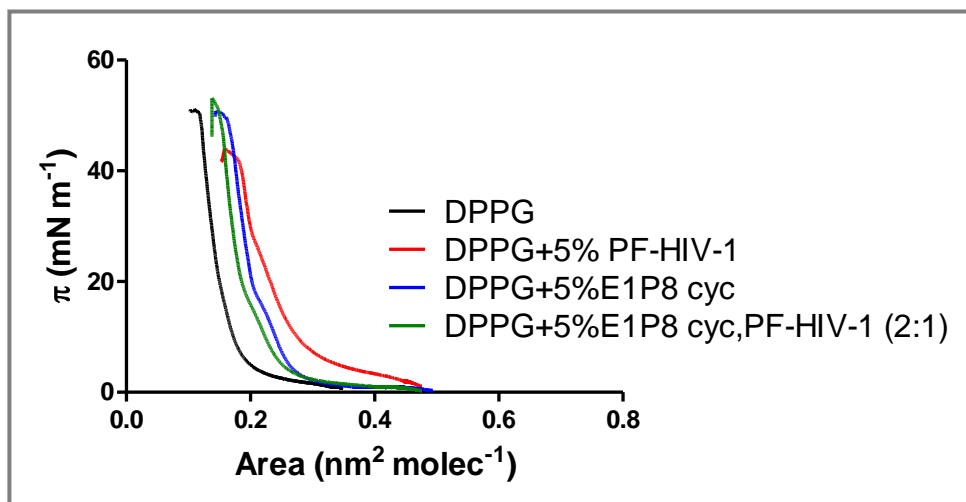


Figura 65: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPG con el 5% de PF-HIV-1, E1P8 cyc y la mezcla E1P8 cyc/PF-HIV-1 (2:1) extendidas sobre la subfase de agua.

La Figura 65 muestra las curvas π -A de las isotermas de DPPG puro y en presencia de 5% de PF-HIV-1, E1P8 cyc y mezcla E1P8 cyc/PF-HIV-1 (2:1). Se observa que la presencia de E1P8 cyc o el PF-HIV-1 en la subfase causa una expansión de la película de lípido, lo que sugiere que los péptidos están ocupando espacio en la subfase o incluso que están interactuando con el DPPG lo suficiente como para alterar el normal empaquetamiento de los lípidos. Cuando se añade un 5% de la mezcla E1P8 cyc/PF-HIV-1 a la subfase, la isoterma se desplaza hacia valores de área por molécula más grandes que la monocapa de lípido puro. La forma de la isoterma de la mezcla de E1P8 cyc/PF HIV-1/DPPG resulta ser muy parecida a la isoterma de la monocapa de E1P8 cyc/DPPG. Este comportamiento parece indicar un cambio en la forma que el PF-HIV-1 interactúa con DPPG en la interfase,

debido a la presencia del péptido cíclico. Se observaron resultados similares en la sección anterior, donde se exponían los resultados de monocapas mixtas de E1P8 cyc/PF HIV-1/POPG.

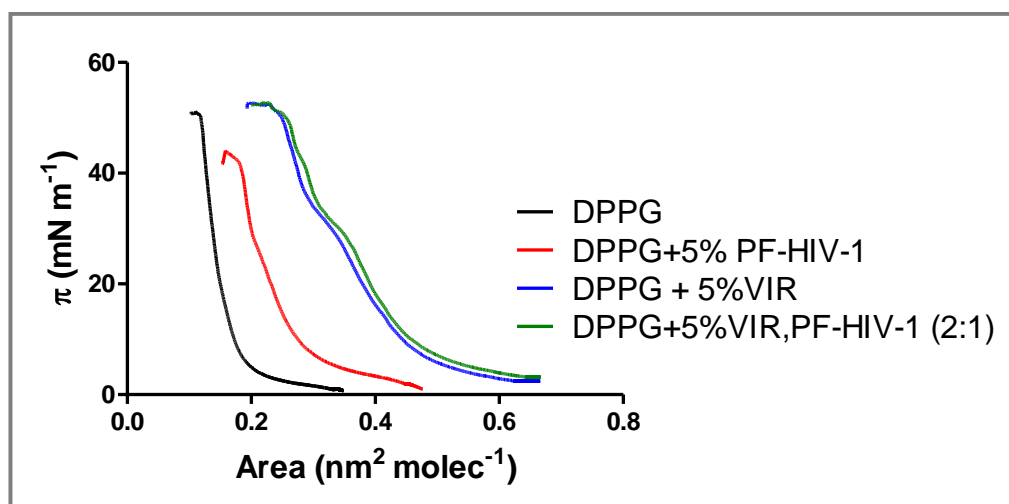


Figura 66: Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPG con el 5% de PF-HIV-1, VIR y mezcla VIR/PF-HIV-1 (2:1) extendidas sobre la subfase de agua.

Se analizó también como el péptido VIR afecta la interacción del PF-HIV-1 y el DPPG, en las mismas condiciones que el péptido E1P8 cyc. El péptido VIR, como se ha descrito en los precedentes párrafos, interactúa con el PF-HIV-1, inhibiendo la entrada del virus en las células [95]. En la Figura 66 se observa cómo la forma de la isoterma de PF-HIV-1 y el DPPG cambia drásticamente cuando el PF del HIV-1 se mezcla con el VIR. Como se observó en presencia del E1P8 cyc, el VIR parece inhibir el efecto del PF HIV-1 sobre las monocapas de DPPG. De hecho, la isoterma en presencia de la mezcla de PF HIV-1/VIR/DPPG resulta muy parecida a la isoterma VIR/DPPG.

Para caracterizar mejor el efecto de los péptidos sobre el estado físico de las monocapas de lípidos, las películas se prepararon en presencia de 1% molar de la sonda fluorescente NBD-PC y se transfirieron a un portaobjetos de vidrio. Las observaciones microscópicas de las

monocapas de DPPG (Figura 67) mostraron dominios oscuros con áreas verdes brillantes que indicaban una coexistencia de dos fases, líquido expandido y líquido condensado (LE-LC). Durante la compresión, los dominios LC oscuros aumentaron y crecieron de tamaño provocando la exclusión de la sonda fluorescente de la fase LE, hasta su definitiva desaparición a 12 mN m^{-1} .

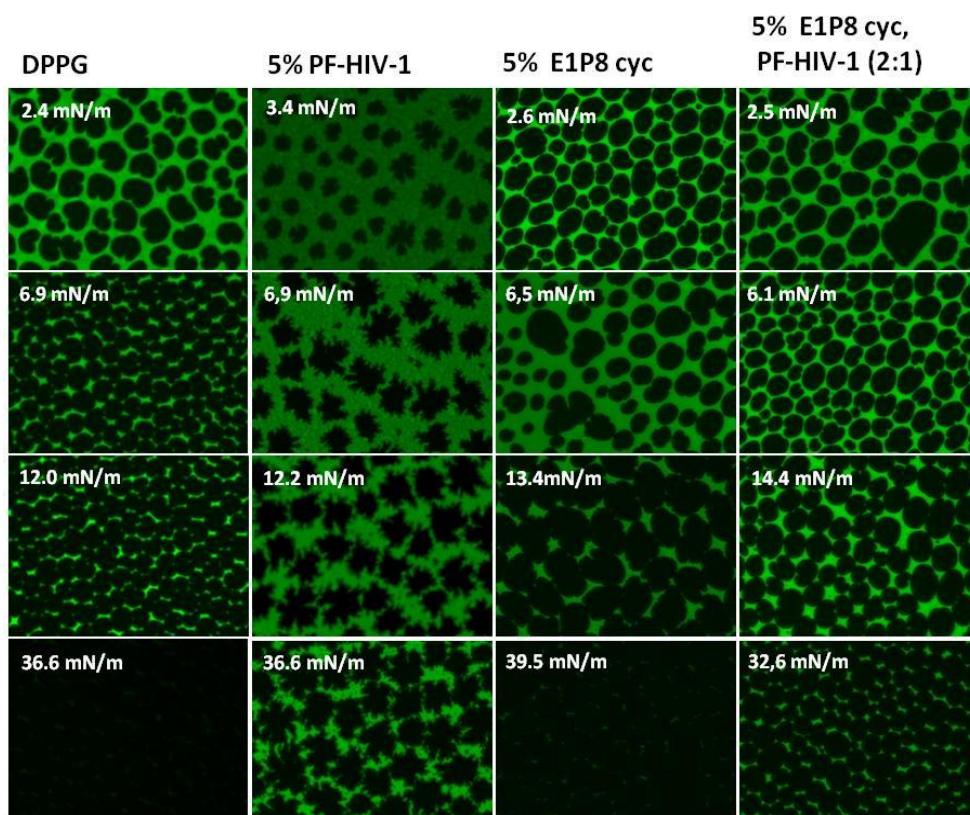


Figura 67: Imágenes de epifluorescencia de monocapas de DPPG y en presencia de 5% PF-HIV-1, E1P8 cyc, E1P8 cyc/PF-HIV-1. Las imágenes de las películas LB transferidas durante una compresión continua fueron tomadas a las presiones superficial indicadas.

La adición de 5% de PF-HIV-1 a la monocapa, como se ha descrito en el capítulo anterior, perturbó el empaquetamiento normal de las monocapas de DPPG. El péptido PF-HIV-1, tal

y como se describe en la bibliografía, provocó la formación de dominios de estructura ramificada [133]. Además, la isoterma mostró dominios rodeados por regiones verdes bien definidas que todavía permanecían en fase LE hasta $36,6 \text{ mN m}^{-1}$. Este resultado indicó que, en presencia de PF-HIV-1, la monocapa necesitaba ser comprimida a presiones más altas para completar la transición. La fase LE mostró, a presión superficial baja, dos niveles de verde diferentes, que podrían indicar una acumulación preferencial de PF HIV-1 en esta fase [70].

Cuando se analizó el efecto de E1P8 cyc sobre la monocapa de DPPG, se observó una influencia menor en la transición de fase. La Figura 67 muestra que, a presión superficial baja (alrededor de 2 mN m^{-1}), el péptido cíclico no modifica la forma de los dominios del lípido. Sin embargo, se observa un aumento aparente en el número de dominios de la monocapa fosfolípicas. Al igual que las monocapas de DPPG, las monocapas con E1P8 cyc muestran una transición de fase de LC a LE que empieza a presiones superficiales muy bajas (menos de 1 mN m^{-1}) y termina por encima de 10 mN m^{-1} . Este comportamiento puede ser debido a una interacción superficial entre el péptido cíclico y el lípido que no altera la forma en que la transición de fase tiene lugar, modificando el proceso general en un menor grado que el PF-HIV-1 [168, 221, 222].

Estos experimentos se repitieron con el 5% de la mezcla PF HIV-1/E1P8 cyc en una relación molar de péptidos 1:2. Sorprendentemente, el péptido cíclico parece anular el efecto del PF-HIV-1 sobre la transición de fase de DPPG. Las monocapas con E1P8 cyc/PF-HIV-1 mostraron dominios de forma y tamaño similares a los observados en monocapas de E1P8 cyc, en contraste con las modificaciones en la forma y distribución de los dominios observadas cuando el PF-HIV-1 se incluye en la monocapa. Posiblemente E1P8 cyc excluye el PF-HIV-1 de la monocapa de DPPG.

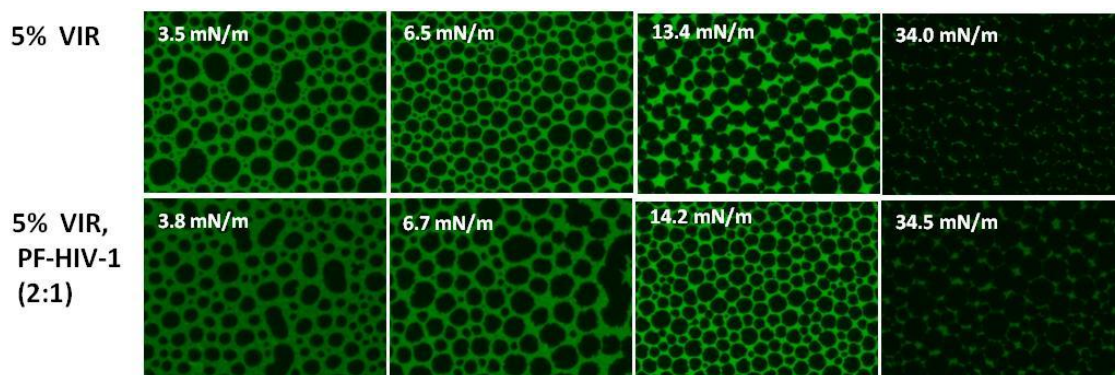


Figura 68: Imágenes de microscopía de fluorescencia de monocapas de DPPG en presencia de 5% VIR y VIR/PF-HIV-1. Las imágenes de las películas LB transferidas durante una compresión continua fueron tomadas a las presiones superficiales indicadas.

El péptido VIR mostró un comportamiento comparable al del E1P8 cyc. El efecto del PF-HIV-1 en la monocapa de lípidos parece ser inhibido en presencia de VIR. La Figura 68 muestra que la influencia del VIR sobre el lípido es más efectiva que la del PF-HIV-1, especialmente a presiones superficiales bajas. La forma, el tamaño y el número de dominios oscuros de la mezcla VIR/PF-HIV-1/DPPG resultan muy parecidos a los observados en monocapas que contienen sólo el péptido VIR.

De acuerdo con los estudios de miscibilidad en presencia del lípido POPG, los resultados mostraron que la presencia del E1P8 cyc inhibe la interacción entre el PF-HIV-1 y el lípido DPPG.

Considerando que los mismos resultados se mostraron cuando a la monocapa de PF-HIV-1 y DPPG se adicionó el VIR, que se ha demostrado interacciona con el PF-HIV-1 [95], y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios de FRET, que se han descrito en los párrafos anteriores, se supone que esta inhibición sea debida a una interacción entre el PF-HIV-1 y el péptido cíclico.

Un comportamiento parecido se observó en presencia de la estructura lineal del E1P8, tal y como se ha descrito en el capítulo anterior. La Figura 48 muestra imágenes de microscopía del efecto producido por la mezcla E1P8/PF-HIV-1 en monocapas de DPPG. La presencia del E1P8 lineal, al igual que su derivado cíclico, pareció anular el efecto del PF-HIV-1 en la transición de fase de DPPG. Pero la presencia del PF-HIV-1 también alteró el comportamiento del E1P8, retrasando la transición de fase. Aunque es posible que la presencia simultánea del PF-HIV-1 y el E1P8 induzca un cambio en la forma en que PF-HIV-1 interactúa con la monocapa la presencia del E1P8 lineal no se puede explicar como una total exclusión de PF-HIV-1 de la monocapa. Por lo tanto, la influencia del péptido cíclico en la interacción PF-HIV-1/DPPG parece ser más efectiva respecto a la secuencia lineal.

3.9 Estudio de interacción del E1P8 cyc con el PF-HIV-1 mediante el ensayo de hemólisis

En el capítulo anterior, se comprobó que la secuencia lineal E1P8 interacciona con el PF-HIV-1 disminuyendo su actividad hemolítica y inhibiéndola al 100% ya a la relación molar 1:1 PF-HIV-1/E1P8 (100 μ M).

En este capítulo se ha estudiado la capacidad del E1P8 cyc de inhibir la actividad hemolítica del PF-HIV-1. 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 del E1P8 cyc, disminuía el porcentaje de hemólisis del PF-HIV-1 (Figura 69). El péptido E1P8 cyc, ya a la relación molar 1:0,1 (PF-HIV-1:E1P8 cyc), afectaba de manera drástica a la actividad hemolítica del PF-HIV-1 disminuyéndola un 65%, y a la relación 1:1 la actividad hemolítica inducida por PF-HIV-1 estaba totalmente inhibida.

Para comprobar la especificidad de la interacción entre el PF-HIV-1 y el E1P8 cyc, se utilizaron como péptidos control el VIR, el PF-MLV, la melitina y el péptido E1P32, el

cual, según estudios previos realizados en nuestro laboratorio, no interacciona con el PF-HIV-1.

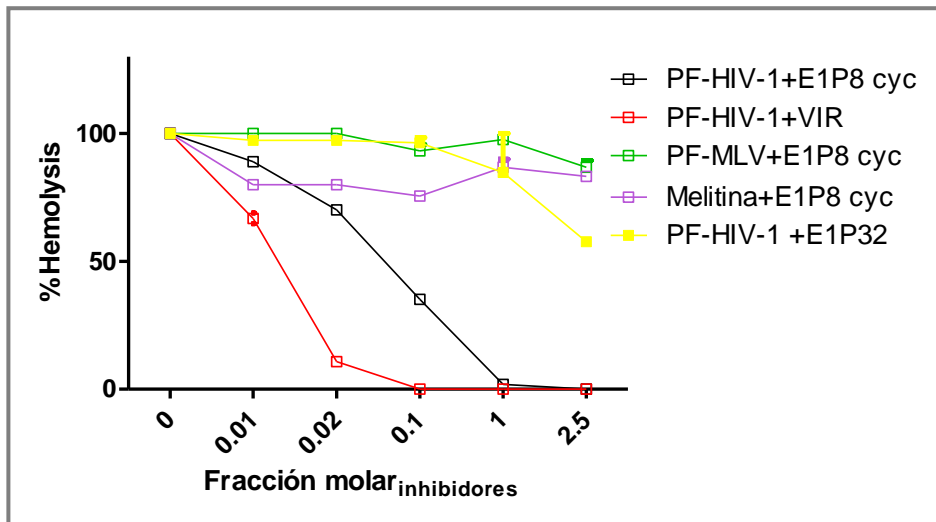


Figura 69: Efecto inhibitorio del péptido cíclico E1P8 sobre la actividad hemolítica del PF-HIV-1. Las relaciones molares ensayadas PF-HIV-1 y el E1P8 cyc fueron 1:0,01; 1:0,02; 1:0,1; 1:1; 1:2,5. Se realizó el ensayo en presencia de PF-MLV, Melitina, VIR y E1P32.

Como se muestra en la Figura 69, el péptido VIR, de acuerdo con publicaciones precedentes [95], inhibe la actividad hemolítica del PF-HIV-1, ya a la relación 1:0,1 (PF-HIV-1:VIR). Mientras en presencia del péptido E1P32 la actividad hemolítica del PF-HIV-1 no se ve afectada. La melitina, como se ha descrito anteriormente, presenta también actividad hemolítica. Cuando se adicionaron concentraciones crecientes del E1P8 cyc no se observaron variaciones significativas de la actividad hemolítica de la melitina. El péptido cíclico tampoco fue capaz de inhibir la hemólisis causada por el péptido PF-MLV, aunque este péptido provocaba una liberación de hemoglobina mucho menor que el PF-HIV-1 y la melitina.

Por lo tanto, el ensayo de hemolisis demostró que el E1P8 cyc inhibía de manera específica la actividad hemolítica del PF-HIV-1.

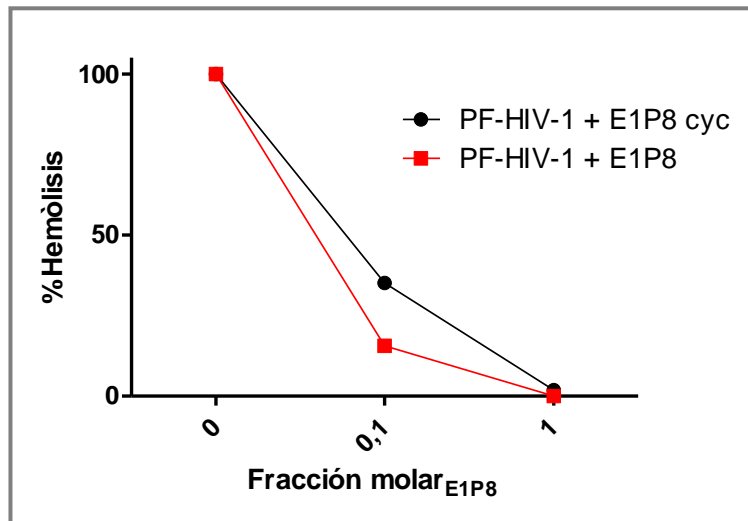


Figura 70: Efecto inhibitorio de los péptidos E1P8 y E1P8 cyc sobre la actividad hemolítica inducida por el PF-HIV-1. Las relaciones molares ensayadas PF-HIV-1:E1P8 (lineal y cíclico) fueron 1: 0,01; 1:1

En la Figura 70 se compara la capacidad del E1P8 lineal y del E1P8 cyc de inhibir la actividad hemolítica del PF-HIV-1, a las relaciones molares 1:0,1 y 1:1 (PF-HIV-1:E1P8 cyc). Los dos péptidos inhiben al 100% la actividad hemolítica del PF-HIV-1 a la relación 1:1 (100 μ M de péptido inhibidor). Pero a la relación 1:0,1, el péptido lineal presenta una mayor actividad inhibitoria que la estructura cíclica, disminuyendo la hemólisis inducida por el PF-HIV-1 del 80%, mientras el E1P8 cyc la reduce del 65 %. Por lo tanto, aunque los dos péptidos se comportan como buenos inhibidores de la actividad hemolítica del PF-HIV-1, el E1P8 lineal resulta ser más efectivo que el E1P8 cyc.

3.10 Estudio conformacional de interacción del péptido E1P8 cyc y el PF-HIV-1 mediante dicroísmo circular (CD)

Mediante la técnica de dicroísmo circular se analizó la conformación adoptada por el péptido E1P8 cyc y los cambios producidos en el espectro experimental de CD de las mezclas PF-HIV-1/E1P8 cyc a diferentes concentraciones molares en medio acuoso. 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 la medida. En tampón acuoso el péptido E1P8 cyc se comporta igual que la secuencia E1P8 lineal; no adopta ninguna conformación definida, y presenta una mezcla de estructuras con un elevado porcentaje de forma desordenada (Figura 71).

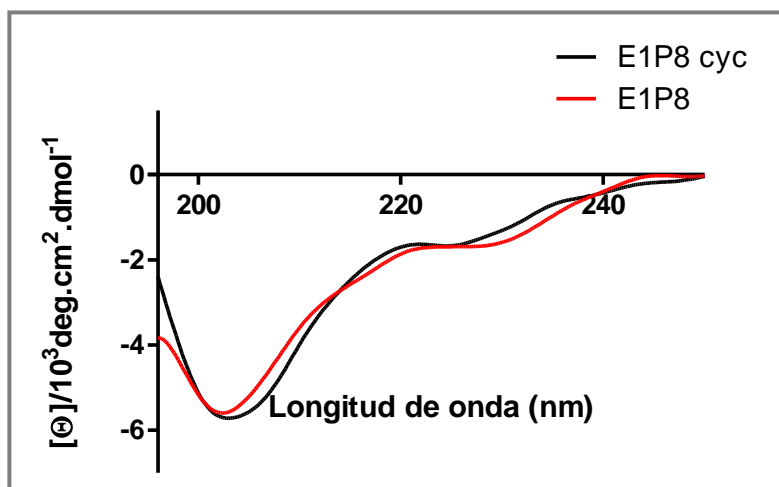


Figura 71: Espectros de CD obtenidos a 50 μM de E1P8 cyc y E1P8 lineal.

El PF-HIV-1, como se había descrito en el capítulo anterior, presenta una banda negativa con máximo de absorción a 218 nm que podría ser atribuida a una estructura de tipo β [69].

Seguidamente, se analizaron los cambios producidos en el espectro experimental de CD de las mezclas del PF-HIV-1 con el E1P8 cyc a diferentes concentraciones molares en medio acuoso.

Los espectros experimentales obtenidos de las mezclas del PF-HIV-1 y el péptido E1P8 cyc resultan diferentes a los teóricos obtenidos tras considerar la suma de los espectros experimentales de cada uno de los péptidos por separado.

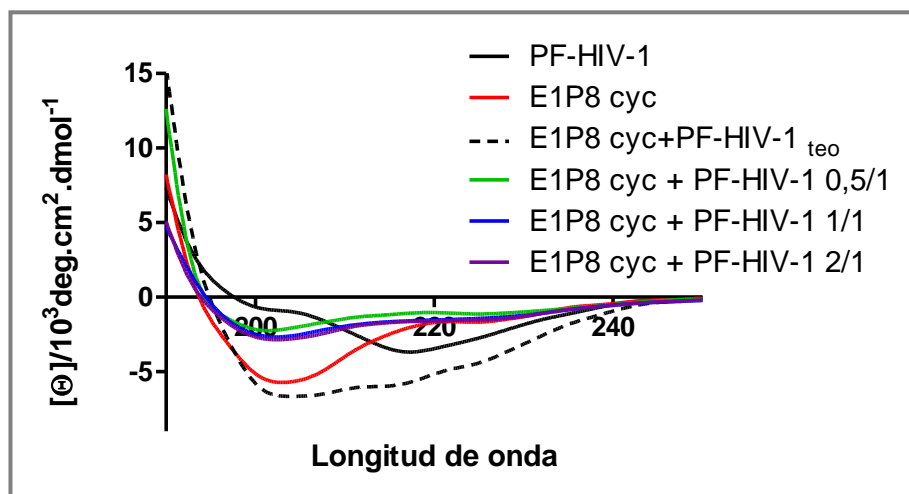


Figura 72: Espectros de CD obtenidos a 50 μM de PF-HIV-1 y E1P8 cyc, y la mezcla de los péptidos a diferentes fracciones molares del E1P8 cyc. Espectro teórico del CD calculado a partir de la suma de los espectros de cada uno por separado.

En todas las mezclas ensayadas se han registrado espectros de DC (Figura 72) caracterizados por tener una banda negativa alrededor de 220 nm y otra menos intensa alrededor de 230 nm que son indicativas de estructuras desordenadas. A partir de los espectros del DC del E1P8 cyc y de sus mezclas con el PF-HIV-1, se obtuvieron los valores de elipticidad a 222 nm, aplicando la ecuación (29), descrita en el capítulo anterior, se calculó el porcentaje de α -hélice en la estructura secundaria.

Tabla 20: Valores en porcentaje del contenido de α -hélice en estructura secundaria del PF-HIV-1, E1P8 cyc y de las mezclas E1P8 cyc/PF-HIV-1 a diferentes relaciones molares.

Péptidos	Relación molar E1P8 cyc/PF-HIV-1	% α -Helice
PF-HIV-1	1	11
E1P8 cyc	1	4,9
	0,5/1	2,9
	1/1	4,0
	2/1	4,2

Los resultados (Tabla 20) sugieren, como en el caso del E1P8 lineal, que el péptido E1P8 cyc interacciona con el PF-HIV-1, reduciendo la elipticidad media por residuo a 222 nm.

Se llevó a cabo el experimento de DC en presencia de lípidos de POPG, ya que se ha visto [241] que el PF-HIV-1 interacciona más con fosfolípidos aniónicos que con los lípidos sin carga neta [184].

En primer lugar se registraron los espectros de dicroísmo de PF-HIV-1, E1P8 cyc y del control VIR en presencia de LUVs de POPG (0,3 mM). A continuación se preincubaron el péptido cíclico y el control con PF-HIV-1 a la relación molar 2:1 (E1P8/PF-HIV-1) durante 30 minutos en tampón PBS, y finalmente se adicionaron a los liposomas.

El espectro experimental del PF-HIV-1 en presencia de liposomas muestra (Figura 73) una banda positiva alrededor de 200 nm y una negativa menos intensa a 222 nm que podrían ser atribuidas a la estructura β , probablemente debido a la agregación del péptido.

Los espectros del péptido E1P8 cyc y del VIR mostraron dos bandas negativas, una alrededor 200 nm y otra menos intensa entre 220-240 nm, típicas de una estructura *random coil*.

El espectro de DC de las mezclas del PF-HIV-1 con el E1P8 cyc se caracterizó por la presencia de una banda negativa alrededor 220 nm y otras débiles positivas alrededor de 200 nm que podría indicar la presencia de una conformación giro β .

El espectro de la mezcla VIR con el PF-HIV se caracterizó por la presencia de una banda negativa alrededor de 215 nm, otra negativa a 227 y débiles bandas positivas alrededor de 200 nm, indicando la presencia de diferentes estructuras β . En los dos casos los espectros resultaron diferentes a los teóricos obtenidos considerando la suma de los espectros experimentales de cada uno de los péptidos por separado.

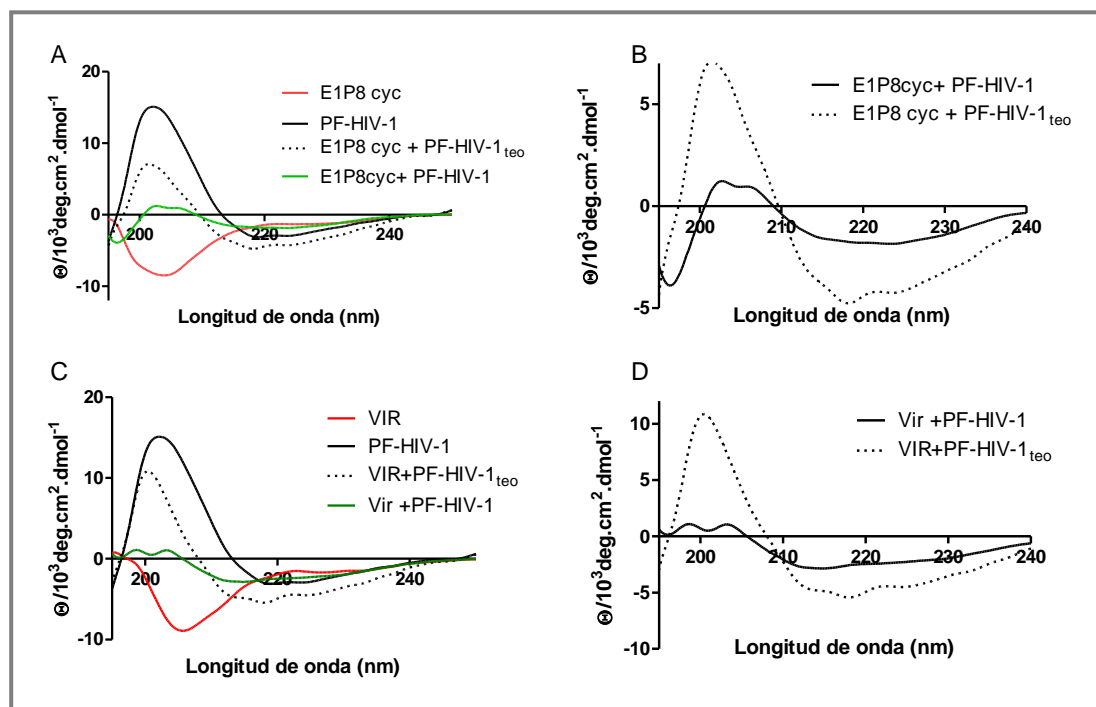


Figura 73: Espectros de CD obtenidos a 50 μM de PF-HIV-1, E1P8 cyc (A) y VIR (B), y la mezcla de los dos péptidos y el PF-HIV-1 a la relación molar (2:1. Péptido/PF-HIV-1) en presencia de liposomas de POPG. Espectro teórico del CD calculado a partir de la suma de los espectros de cada uno por separado. En B y D se muestran los espectros de las mezcla experimental y teórica.

A partir de los espectros del DC de los péptidos y de sus mezclas con el PF-HIV-1, se sacaron los valores de elipticidad a 222 nm y mediante la ecuación (29) se calculó el porcentaje de α -hélice en la estructura secundaria.

Los valores del porcentaje de hélice α se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21: Valores en porcentaje del contenido de α -hélice en las estructuras secundarias del PF-HIV-1, E1P8 cyc, VIR y de las mezclas en presencia de liposomas de POPG.

Péptidos	Relación molar Péptido/PF-HIV-1	% α-Helice
PF-HIV-1	1	8,4
E1P8 cyc	1	3,9
	2/1	4,9
VIR	1	3,8
	2/1	6,5

Los resultados muestran que en las mezclas hay una disminución del porcentaje de α hélice. Parece que ambos péptidos se comportan de la misma forma, dado que interaccionan con el PF-HIV-1 provocando una disminución de su estructura β . Probablemente impiden la agregación del PF-HIV-1.

Considerando todos los resultados obtenidos en el actual trabajo de tesis, se puede concluir que la modificación del E1P8 en forma de ciclo mejora su actividad anti-HIV-1, inhibiendo la replicación *in vitro* del virus del HIV-1 con una actividad 20 veces mayor que su secuencia lineal. Los resultados del ensayo de hemólisis y de los ensayos biofísicos muestran que el péptido cíclico interacciona con el PF-HIV-1 de forma similar a su secuencia lineal. Por lo tanto, es la versión cíclica de la región (22-39) de la proteína E1 del GBV-C la mejor candidata para abordar el diseño de nuevos péptidos derivados del virus GVB-C como potencial inhibidor de la entrada del virus del HIV-1 a las células.