

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICAS



CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA Y
ESTRUCTURAL DE INHIBIDORES
PROTEICOS DE VIH-1 DIRIGIDOS
CONTRA GP41

Tesis Doctoral

2019

SAMUEL JURADO URDIALES

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Samuel Jurado Urdiales
ISBN: 978-84-1306-469-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/60261>

ÍNDICE

ABREVIATURAS	- 10 -
CAPÍTULO 1:	- 12 -
INTRODUCCIÓN AL VIH-1	- 12 -
1.1 HISTORIA DEL VIH	- 13 -
1.2 MORFOLOGÍA DEL VIH-1	- 15 -
1.3 CICLO DE INFECCIÓN DEL VIH	- 16 -
1.4 TRATAMIENTO DEL VIH-1	- 22 -
1.5 FUTURO DEL TRATAMIENTO	- 25 -
1.6 ENV Y LOS PRIMEROS PASOS DE LA INFECCIÓN	- 27 -
1.7 SISTEMAS MIMÉTICOS DE GP41	- 34 -
1.8 PROTEÍNAS COVNHR	- 35 -
1.9 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 38 -
CAPITULO 2:	- 40 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 40 -
2.1 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	- 41 -
2.2.1 <i>Secuencias de las proteínas</i>	- 41 -
2.2.2 <i>Pruebas de expresión</i>	- 41 -
2.2.4 <i>Producción y purificación de proteínas</i>	- 45 -
2.2 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LAS PROTEÍNAS.....	- 47 -
2.2.1 <i>Dicroísmo circular (CD)</i>	- 47 -
2.2.2 <i>Dispersión dinámica de luz (DLS)</i>	- 50 -
2.2.3 <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	- 51 -
2.2.4 <i>Calorimetría isotérmica de titulación (ITC)</i>	- 53 -
2.2.4.1 <i>Ensayos de ITC directos</i>	- 55 -
2.2.4.2 <i>Ensayos ITC de desplazamiento</i>	- 56 -
2.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD	- 58 -
2.4.1 <i>Estudios de unión de las proteínas a ENVs de VIH-1 mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)</i>	- 58 -
2.4.2 <i>Ensayos de inhibición del VIH-1 TZM-bl</i>	- 59 -
CAPITULO 3:	- 61 -
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y TERMODINÁMICO DE LA INHIBICIÓN DE LA FUSIÓN DEL VIH-1 USANDO PROTEÍNAS PEQUEÑAS MIMÉTICAS DE GP41.. -	61 -
3.1 INTRODUCCIÓN.....	- 62 -
3.2 OBJETIVOS	- 64 -
3.3 RESULTADOS	- 65 -
3.3.1 <i>Diseño de las proteínas covNHR y caracterización biofísica</i>	- 65 -
3.3.2 <i>Caracterización de la unión de las proteínas covNHR a péptidos de la región CHR</i> .-	68 -
3.3.3 <i>Estudio del complejo covNHR-VQ y C34 por cristalografía de rayos X</i>	- 76 -
3.3.4 <i>Inhibición de la infección de VIH-1</i>	- 78 -
3.3.5 <i>Unión de las proteínas covNHR a ENVs nativas</i>	- 80 -

3.4 DISCUSIÓN.....	- 82 -
3.4.1 Características estructurales y termodinámicas de la interacción NHR-CHR.....	- 82 -
3.4.2 Mecanismo molecular de resistencia a péptidos miméticos a CHR.....	- 83 -
3.4.3 CovNHR dirigidos a ENV nativas de VIH-1	- 84 -
3.4.4 Las proteínas covNHR potentes inhibidores de VIH-1	- 85 -
3.5 CONCLUSIONES	- 87 -
CAPITULO 4:.....	- 88 -
CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LAS INTERFASES DE INTERACCIÓN NHR-CHR EN GP41.....	- 88 -
4.1 INTRODUCCIÓN.....	- 89 -
4.2 OBJETIVO.....	- 91 -
4.3 RESULTADOS	- 92 -
4.3.1 Clasificación de los péptidos según el número de regiones con las que interaccionan	- 93 -
4.3.2 Análisis de unión covNHR y péptidos CHR por CD	- 93 -
4.3.2.1 Dicroísmo Circular en el UV lejano. 200-260 nm	- 93 -
4.3.2.2 Dicroísmo circular en el UV cercano. 250-350 nm.....	- 96 -
4.3.3 Caracterización termodinámica por ITC	- 98 -
4.3.3.1 Ensayos directos ITC.....	- 99 -
4.3.3.2 Ensayos ITC de desplazamiento.....	- 100 -
4.3.3.3 Cálculo del incremento de capacidad calorífica de unión	- 102 -
4.3.4 Resumen termodinámico de los parámetros obtenidos	- 103 -
4.3.5 Estudio de comunicación entre el bolsillo hidrofóbico y el bolsillo N-terminal. -	108 -
4.4 DISCUSIÓN.....	- 111 -
4.5 CONCLUSIONES	- 117 -
CAPÍTULO 5:.....	- 118 -
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE MINIPROTEÍNAS COVNHR QUE AYUDEN A LA COMPRESIÓN DEL MECANISMO DE INHIBICIÓN CON GP41 COMO DIANA- 118 -	
5.1 INTRODUCCIÓN	- 119 -
5.2 OBJETIVOS.....	- 123 -
5.3 RESULTADOS	- 124 -
5.3.1 Diseño, producción y purificación	- 124 -
5.3.2 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA.....	- 125 -
5.3.2.1 Caracterización estructural por CD	- 125 -
5.3.2.2 Caracterización de tamaño molecular y agregación mediante DLS.....	- 128 -
5.3.3 Caracterización termodinámica de unión covRECs y péptidos CHR	- 130 -
5.3.3.1 Experimentos de unión por dicroísmo circular	- 131 -
5.3.3.2 Caracterización termodinámica de la unión por ITC	- 133 -
5.3.4 Caracterización funcional de covRECs.....	- 136 -
5.3.4.1 Ensayos de unión a ENVs estabilizadas.....	- 136 -
5.3.4.2 Experimentos de inhibición con covRECs con diferentes cepas de VIH-1	- 138 -
5.4 DISCUSIÓN.....	- 140 -
5.4.1 Estructura, tamaño molecular y estabilidad térmica	- 140 -
5.4.2 Capacidad de unión a regiones miméticas de CHR.....	- 141 -
5.4.3 Capacidad de unión a ENV nativas.....	- 143 -
5.4.4 CovREC como inhibidor de la infección por VIH-1.....	- 144 -

5.5 CONCLUSIONES	- 146 -
CAPÍTULO 6 :.....	- 147 -
ESTABILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA COVREC-NTP MEDIANTE LA INSERCIÓN DE UN PUENTE DISULFURO	- 147 -
6.1 INTRODUCCIÓN.....	- 148 -
6.2 OBJETIVOS.....	- 150 -
6.3 RESULTADOS	- 151 -
6.3.1 <i>Expresión y purificación</i>	- 151 -
6.3.2 <i>Caracterización biofísica de las nuevas variantes</i>	- 152 -
6.3.2.1 Estructura y estabilidad de las proteínas por CD y tamaño molecular por DLS -	152 -
6.3.3 <i>Caracterización termodinámica de la unión a Y24L</i>	- 157 -
6.3.3.1 Experimentos de unión mediante Dicroísmo Circular	- 157 -
6.3.3.2 Interacción mediante calorimetría isotérmica de titulación	- 158 -
6.3.4 <i>Caracterización funcional de las proteínas RECCys</i>	- 161 -
6.3.4.1 Estudios de unión a ENVs nativas estabilizadas de VIH-1 mediante ELISA....	- 161 -
6.3.4.2 Ensayos de inhibición de la infección con diferentes cepas de VIH-1	- 162 -
6.4 DISCUSIÓN.....	- 164 -
6.4.1 <i>Estructura, tamaño y estabilidad térmica</i>	- 164 -
6.4.2 <i>Capacidad de interacción con péptidos miméticos de CHR</i>	- 165 -
6.4.3 <i>Unión a estructuras ENV nativas</i>	- 166 -
6.4.4 <i>Capacidad inhibidora frente a diferentes pseudovirus de VIH-1</i>	- 167 -
6.5 CONCLUSIONES	- 170 -
CAPÍTULO 7:.....	- 171 -
RESUMEN Y CONCLUSIONES	- 171 -
RESUMEN Y CONCLUSIONES	- 172 -
BIBLIOGRAFÍA	- 177 -
ANEXOS	- 187 -

Abreviaturas

2F5	Anticuerpo frente a la región MPER
2G12	Anticuerpo que reconoce patrones de oligomanosas en gp120
4E10	Anticuerpo frente a la región MPER
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CD	Dicroísmo circular en sus siglas en inglés
CHR	Región de hepta-repeticiones en el extremo C-terminal de gp41
CT	Bolsillo C-terminal de covNHR-VQ
DLS	Dispersión dinámica de luz en sus siglas en inglés
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ENV	Estructura formada por el trímero de heterodímeros de gp120 y gp41
Far-UV	Ultravioleta lejano en sus siglas en inglés
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos estadounidense
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad en sus siglas en inglés
Gp120	Glicoproteína de 120 kDa de VIH
Gp41	Glicoproteína de 41 kDa de VIH
HAART	Terapia antirretroviral altamente activa en sus siglas en inglés
HP	Bolsillo hidrofóbico de covNHR-VQ
HTLV	Virus linfotrófico T de humanos en sus siglas en inglés
IP	Bolsillo intermedio de covNHR-VQ
IPTG	Isopropil- β -D-1 tiogalactopiranosido
ITC	Calorimetría isotérmica de titulación en sus siglas en inglés
Ka	Constante de afinidad
Kd	Constante de disociación
LAV	Virus linfadenopático en sus siglas en inglés
MPER	Región proxima a la membrana del virus VIH
Near-UV	Ultravioleta cercano
NHR	Región de hepta-repeticiones en el extremo N-termina de gp41
NTP	Bolsillo N-terminal de covNHR-VQ

OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
O/N	‘Over night’, pasada la noche
PAGE-SDS	Gel de poliacrilamida para electroforesis en condiciones reductoras con SDS
PDB	Dominio de unión al bolsillo hidrofóbico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV	Síndrome de inmunodeficiencia en Simios
STLV	Virus linfotróficos T en simios
T20	Fuzeon® o enfuvirtide, fármaco aprobado como inhibidor de la fusión frente a gp41
T_m	Temperatura de desnaturalización
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ΔC_p	Diferencia en capacidad calorífica
ΔC_{pb}	Diferencia de capacidad calorífica de unión
ΔG	Variación en energía libre de Gibbs
ΔH	Variación en entalpía
ΔH_m	Variación en entalpía de desnaturalización
ΔS	Variación en entropía

CAPÍTULO 1:

Introducción al VIH-1

1.1 Historia del VIH

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o AIDS con sus siglas en inglés, se describe por primera vez en 1981, en Estados Unidos¹. Este síndrome se caracteriza por una depleción o descenso del número de linfocitos T del individuo infectado. El virus al que se relacionó esta enfermedad fue llamado HTLV-3/LAV (**H**uman **T**-**L**ymphotropic **V**irus/**L**ymphomadenopathy **A**sociated **V**irus), debido a su similitud con otros virus de la familia de los *retroviridae* tales como HTLV-1 y HTLV-2.

El HTLV-1 es un retrovirus aislado por primera vez en 1980, presente en áreas de Japón, Sur América y África. La infección del virus HTLV-1 estaba relacionada con casos de Leucemia y linfoma de células T. Por el contrario, el HTLV-2 no presentaba patologías asociadas en humanos. En 1982, se encontró en Japón un virus similar al HTLV-1 que afectaba a macacos (*Macaca fuscata*), y otras especies de simios, al que se denominó STLV-1 (Simian T-Lymphotropic Virus). Fueron descubiertos anticuerpos frente a este virus en un gran número de especies de antiguos primates, por lo que se dedujo que el origen del HTLV-1 vino dado por reactividad cruzada con el virus STLV-1².

En 1985, se descubrió un retrovirus en macacos que generaba inmunodeficiencia, similar al SIDA, este virus se identificó como STLV-3, y se asoció al HTLV-3, cuyo nombre finalmente derivó en Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). El STLV-3 tiene un gran número de similitudes con el VIH, tantas que empezó a denominarse VIS (Virus de la Inmunodeficiencia en Simios). Genera efecto citopático en los linfocitos, tropismo por linfocitos T CD4+, la forma de la cápsida es similar, el tamaño de sus proteínas coincide con las proteínas del VIH, *gag*, *env* y *pol*. Además, existía reactividad cruzada entre los anticuerpos de personas infectadas con VIH³.

Se postula que debió existir un virus intermedio entre STLV-3 y VIH. De numerosos estudios realizados en la década de los 80 en monos verdes africanos se encontraron nuevos anticuerpos frente a nuevas cepas de STLV-3, cepas menos virulentas, que no mostraban signos de inmunodeficiencia. En particular, el virus encontrado en los monos verdes se designó como STLV-3_{AGM}. Por otro lado, un estudio en Senegal aisló suero de prostitutas sanas que presentaban un patrón de anticuerpos inusual frente al VIH, anticuerpos capaces de reaccionar frente a antígenos de la proteína *gag* del virus, pero nula actividad frente a *env* u otros antígenos virales. Sin embargo, sí presentaban

actividad cruzada con el virus STLV-3_{AGM}^{3,4}. Por lo que se reivindicó que existía un virus que tenía más en común con el STLV-3_{AGM} que con el VIH, a este virus se llamó VIH-2 o HTLV-4, cambiando la denominación del VIH que producía inmunodeficiencia a VIH-1. A pesar de denominarse VIH-2, este virus no está asociado a inmunodeficiencia y no se conoce su patogenicidad^{5,6}.

Desde la primera década después de su descubrimiento, el VIH-1 ha infectado a más de 76 millones de persona (según la OMS), de las cuales fallecieron 36 millones⁷. Catalogando al SIDA como la pandemia más mortífera de nuestra época. Desde 1985, se llevó a cabo un esfuerzo titánico para poder encontrar medicamentos capaces de curar o por lo menos frenar el desarrollo de la enfermedad, así como prevenir su expansión, empezando por evitar el contagio.

En los 80 se marcaron varios grupos de riesgo de contagio: homosexuales, personas sexualmente promiscuas, adictos a drogas intravenosas... Ya que, del total de personas infectadas, estos grupos representaban el 90% de infectados⁸. Más adelante se puso de manifiesto infección entre madre infectada/hijo durante la gestación y lactancia⁹.

Finalmente se postuló que el contagio se producía por contacto entre fluidos corporales, como el semen, la mucosa vaginal, la sangre..., por lo que la infección no se podía producir exclusivamente por mantener relaciones sexuales con personas infectadas, o entre drogadictos que compartieran vía de suministro de la droga intravenosa, sino que se podrían infectar personas que hubieran recibido una transfusión sanguínea en un hospital, ya que en las donaciones de sangre todavía no se controlaba la presencia del virus¹⁰.

En la actualidad, según datos del informe ONUSIDA, en 2018 se infectaron 1,7 millones de personas, fallecieron 770.000. En el mundo hay 37,9 millones de infectados de los cuales 23,3 viven bajo tratamiento antirretroviral. Por lo que el desarrollo de nuevas terapias, junto con la prevención de nuevas infecciones, sigue siendo un objetivo fundamental a la hora de frenar la pandemia y conseguir erradicar el virus por completo. Dentro de las estrategias para el diseño de nuevas terapias, el desarrollo de vacunas capaces de impedir la infección mediante el desarrollo de anticuerpos neutralizantes del virus VIH-1, es el principal objetivo a la hora de erradicar de manera efectiva la enfermedad.

1.2 Morfología del VIH-1

El VIH-1 es un virus envuelto, es decir que su cápsida está embebida en el interior de una membrana fosfolipídica, cuya composición es similar a la de las membranas celulares. En la superficie de esa membrana se encuentran presentes las proteínas de membrana del virus, conocidas como gp120 y gp41. Estas proteínas interactúan entre sí de manera no covalente formando un dímero, que a su vez trimeriza formando un trímero de heterodímeros cuya misión es la de reconocer, unirse y comenzar la infección de la célula diana. La gp120 es conocida como proteína de superficie (SU), ya que está en contacto con el medio extracelular, y la gp41 es conocida como proteína de transmembrana (TM), ya que se encuentra cubierta por la gp120 y anclada en la membrana del virus. En el interior de la membrana encontramos la cápsida de morfología pseudo-icosaédrica, formada por la proteína p24 (CA) una vez procesada mediante un corte proteolítico generado por la proteasa (PR) del virus. Dentro de la nucleocápsida encontramos el material genético, así como las otras enzimas encargadas de llevar a cabo la replicación y la integración del material genético en la célula, la retrotranscriptasa (RT) y la integrasa (IN) respectivamente, figura 1.1¹¹.

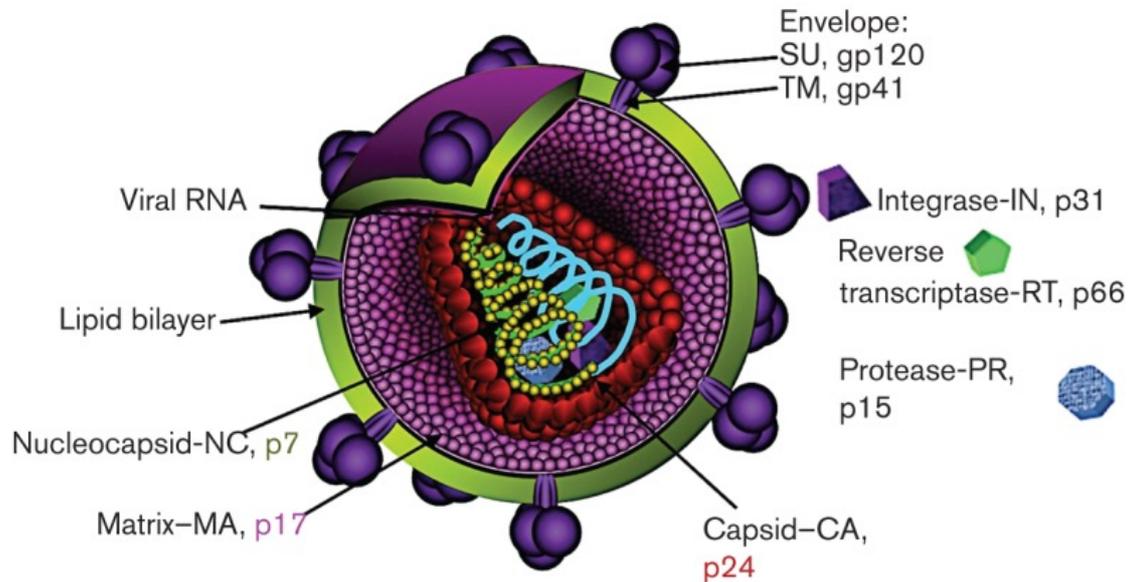


Figura 1.1. Representación del virión VIH-1¹¹

Como se mencionó con anterioridad, el VIH-1 es un retrovirus, es decir que su material genético está formado por cadenas de ARN, que necesitan ser transcritas a ADN por una enzima llamada transcriptasa reversa o retrotranscriptasa. En particular, el VIH-1 tiene 2

cadena de ARN que codifican todas las proteínas que necesita el virus su replicación (figura 1.1).

El genoma viral se puede dividir en 3 regiones diferentes, que codifican proteínas involucradas en diferentes procesos del ciclo viral. *Gag*, encargada de generar las proteínas de la cápsida; *pol*, proteínas indispensables para la replicación viral como la retrotranscriptasa, la integrasa y la proteasa; y *env*, que genera las proteínas presentes en la membrana del virus y son fundamentales en la unión y fusión del virus a la célula diana. Además, por splicing alternativo, su material genético codifica una serie de proteínas como, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr*, que actúan de proteínas de transporte intranuclear, factores de transcripción y potenciadores de la transcripción respectivamente¹²⁻¹⁴.

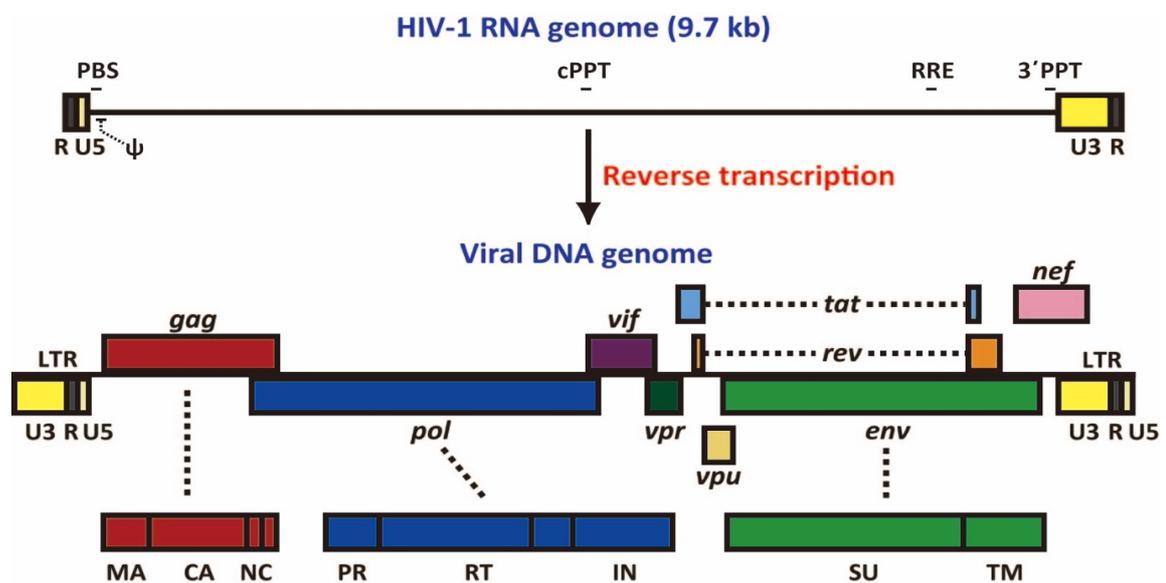


Figura 1.2. Representación grafica del genoma del virus¹².

1.3 Ciclo de infección del VIH

La infección se produce al ponerse en contacto mucosas o plasma infectado con mucosas o plasma no infectado. Si el contacto se produce en la sangre directamente, el virus se disemina por el torrente sanguíneo, dónde ya es capaz de infectar macrófagos/monocitos y linfocitos CD4⁺ presentes en él.

Si, por el contrario, la infección comienza en las mucosas, como por ejemplo la mucosa vaginal, el virus utiliza las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas (DC de sus siglas en inglés) como vía de transporte¹⁵⁻¹⁸. Las células

dendríticas captan las partículas virales gracias a receptores situados en su membrana celular, se han propuesto receptores de tipo leucina los encargados de captar las partículas virales, que reconocen gangliósidos de la membrana viral, como Siglec-1¹⁹. Cuando este proceso se lleva a cabo se produce la maduración de la célula dendrítica, hecho que provoca su migración al ganglio linfóide más cercano para presentar los antígenos a los linfocitos T-helper, como haría con cualquier otro patógeno captado.

De esta manera, el virus se dirigirá hacia el reservorio de sus células diana por excelencia, los linfocitos T CD4⁺, figura 1.3. Por consiguiente, la célula dendrítica actúa de diseminadora del virus por el organismo.

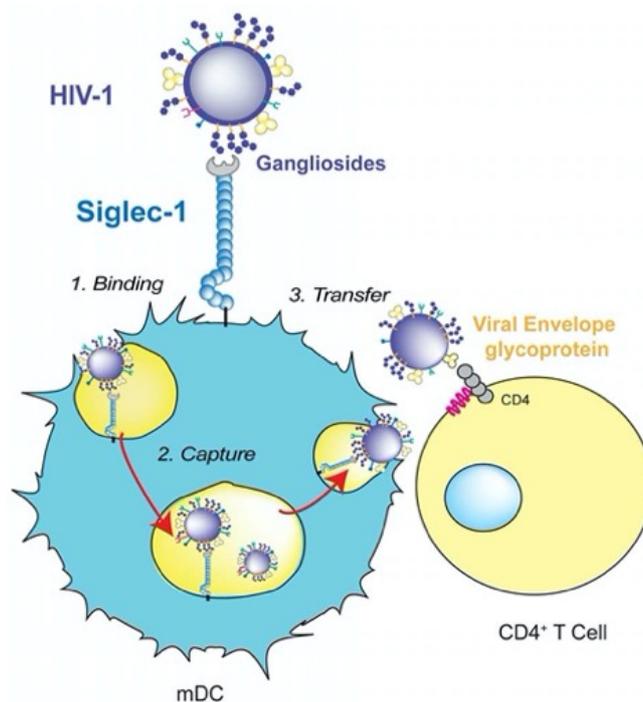


Figura 1.3. Modelo de transmisión de los viriones de VIH-1 producido por las células dendríticas (DC)¹⁹.

Una vez el virus entra en contacto con el linfocito T o con los macrófagos empieza su ciclo infeccioso propiamente dicho²⁰⁻²³. Para empezar, las proteínas de la membrana del virus, concretamente la proteína gp120, es la encargada de reconocer y unirse al receptor CD4 presente en la superficie de la membrana celular (figura 1.4 paso 1), esta unión provoca una serie de cambios conformacionales que permiten la fijación del virus a la membrana celular vía su correceptor CCR5 o CXCR4, receptores normalmente acoplados a CD4. La unión al correceptor dispara el anclaje de la proteína gp41 a la membrana celular, y una serie de interacciones llevadas a cabo por gp41 provocan la mezcla lipídica

de membrana vírica y celular, permitiendo el paso de la cápsida al interior celular (paso 2). Más adelante se explicará de manera más exhaustiva los cambios producidos en las proteínas que finalizan con la entrada del virus en la célula.

Una vez en el interior celular, el ARN es liberado al medio junto con las 3 enzimas principales, (paso 3). La manera en que la cápsida se disocia no se conoce en detalle, aunque varios estudios han tratado de discernir esta cuestión^{21,22}. La retrotranscriptasa empieza a realizar la copia de ADN (ADNc) usando como base la hebra de ARN, (paso 4). Una vez la molécula de ADNc está lista, se importa al núcleo junto con la integrasa ayudada por las proteínas accesorias antes mencionadas, (paso 5).

En el núcleo, el ADN se integra gracias a la interacción de la integrasa y de una proteína celular llamada LEDGF/p75, capaz de reconocer regiones del nucleosoma asociadas a genes altamente transcritos permitiendo así un alto grado de replicación, (paso 6).

Todo este sistema de transcripción está ayudado y potenciado por proteínas víricas antes mencionadas como *tat*¹³. Si al insertarse en el genoma los genes tienen en ese momento una baja tasa de transcripción, el genoma viral quedará en estado silente, o con una tasa muy baja de replicación, generando un reservorio viral que quedará esperando la señal que provoque el comienzo de la transcripción de esa región del genoma celular, favoreciendo la aparición de nuevas partículas virales meses e incluso años después de que se hubiera llevado a cabo la primera infección. Finalizado el proceso de transcripción del ADN viral insertado en el genoma celular, (paso 7), las moléculas de ARN generadas se exportarán al citoplasma, (paso 8) y se traducirán generando todas las proteínas virales necesarias para formar el virión.

Por un lado, se generará la proteína de la cápsida *gag*, que deberá sufrir un corte proteolítico producido por la proteasa del virus, para su maduración y funcionalidad. Las proteínas de la *env* se llevarán vía retículo endoplásmico, y aparato de Golgi a la superficie de la membrana celular, donde esperarán a la llegada de la cápsida preformada con toda la maquinaria replicativa del virus en su interior. Una vez se forme en el citoplasma el pre-virión desnudo, es decir, sin membrana fosfolipídica; se dirigirá hacia la membrana celular por donde saldrá llevándose consigo esa región de la membrana, donde hemos dicho que estarán las proteínas de la *env*, (pasos 9, 10 y 11). Ya en el exterior celular, la proteasa realizará la escisión en *gag*, generando p24, la proteína de la cápsida. De esta manera el virión será completamente funcional para poder infectar una nueva célula, (paso 12).

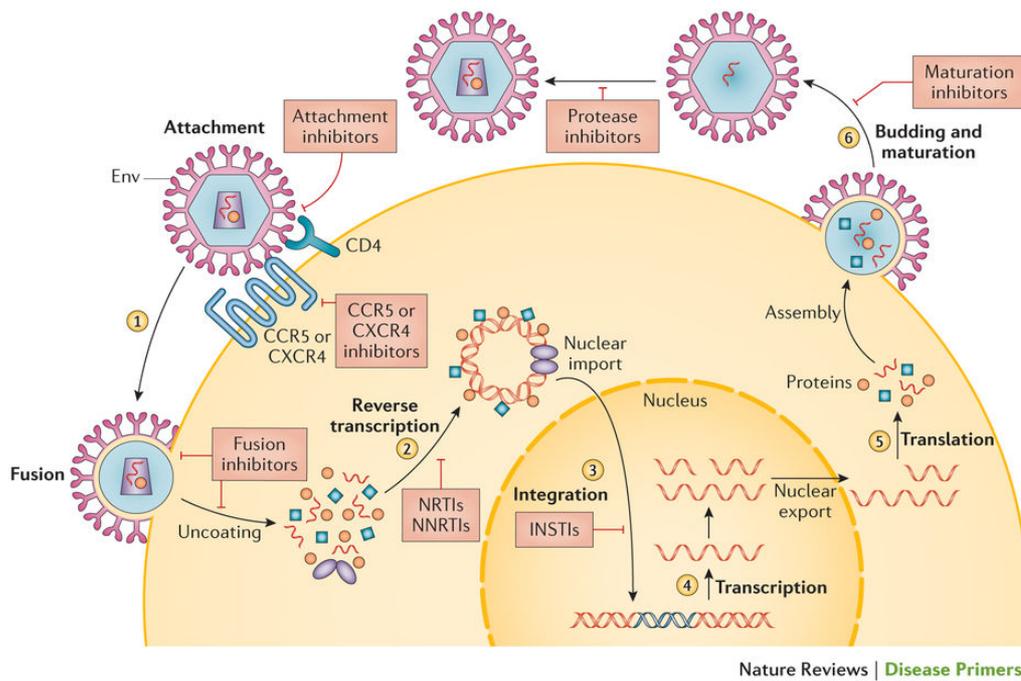


Figura 1.4. Ciclo viral del virus²³.

Como hemos mencionado, el virus adquiere parte de la membrana celular durante su salida de la célula, por lo que, si son producidos un gran número de viriones en una misma célula, la membrana celular sufrirá una alteración en su funcionalidad, aunque no se conoce bien de qué manera se produce el daño citopático, algunos autores postulan un cambio en el balance iónico de la célula $[Na^+]/[K^+]$, o $[Na^+]/[H^+]$, debido a la aparición de poros en la superficie celular, por donde se perdería la relación iónica o incluso se postula alguna interacción entre proteínas del virus con canales iónicos que perdiesen su funcionalidad^{22,24}. Este hecho provocaría un intento de regulación osmótica que conllevaría un mal funcionamiento celular y la muerte de la célula. Si bien, esta alteración de la distribución iónica de la célula puede ser una de las razones del efecto citopático producido por el VIH-1, no sería la única causa que provocaría la muerte celular.

Durante el ciclo viral, hay un momento en el que las proteínas de la env se encuentran en la superficie celular. En ese momento, se podría llevar a cabo una infección célula-célula mediada por dichas proteínas. Es decir, el dímero de heterotrímeros formados por gp120 y gp41 sería funcional, antes incluso a que se llevara a cabo la completa maduración del virión. Por lo tanto, la gp120 presente en la superficie celular podría reconocer el receptor CD4 de la célula vecina, disparando así los mecanismos de fusión llevados a cabo por gp41, mezclando los lípidos de las dos membranas celulares y provocando la

diseminación del material genético viral, así como de sus proteínas²⁵. Mediante la formación de una sinapsis virológica, la célula infectada se fijaría a la célula vecina mediante las proteínas del virus y moléculas de adhesión (ICAM), facilitando que los viriones producidos se pusieran en contacto de forma inmediata con el receptor y correceptor CD4, CCR5/CXCR4 de la célula sin infectar²⁵⁻²⁷.

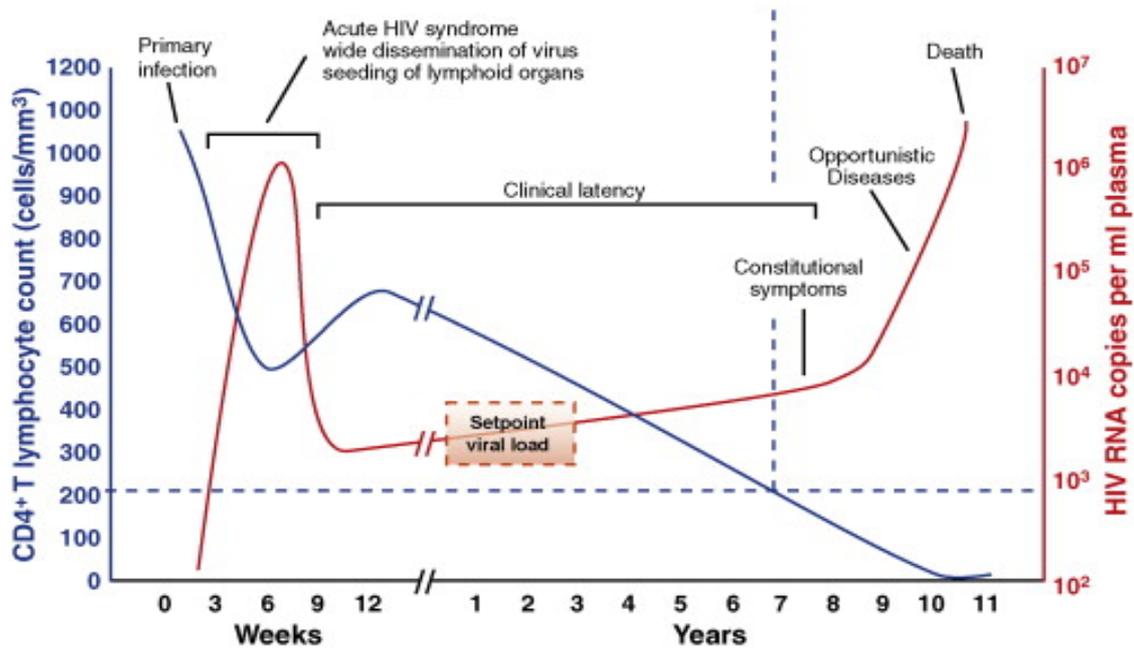


Figura 1.5. Desarrollo de la infección del VIH-1 en años²⁶.

Una vez se ha producido la infección el progreso hacia la inmunodeficiencia es lento, a veces de años. Si observamos la clásica imagen del desarrollo de la enfermedad (figura 1.5)²⁸, durante las primeras semanas de infección se lleva a cabo la diseminación del virus, como podemos observar, aumenta la cantidad de ARN viral (línea roja), y un primer descenso del número de linfocitos T CD4⁺ (línea azul), aunque con un primer repunte debido a que el sistema inmune prolifera tratando de detener la infección. Una vez transcurridas las primeras semanas de infección, comienza a descender el número de copias del virus. Es el momento en el que el virus entra en fase de latencia y cuando se generan los reservorios, ya que su material genético se encuentra insertado en el genoma celular en estado silente. La fase de latencia durará años y, durante este tiempo, se irá reduciendo el número de linfocitos en el organismo, así como lentamente aumentará la carga viral. No será hasta varios años después de haberse infectado cuando se detectarán los síntomas de la enfermedad propiamente dicha, es decir, los síntomas de la inmunodeficiencia adquirida.

Es importante decir que el virus en sí mismo no mata al individuo, ya que estaría destruyéndose a sí mismo, digamos que simplemente reduce al mínimo la cantidad de linfocitos T CD4+ y macrófagos/monocitos disponibles en el organismo. Si bien, este hecho resulta fatídico, ya que los macrófagos/monocitos forman parte de la respuesta inmune innata, es decir, la primera respuesta del sistema inmune frente a una infección. El macrófago fagocita al patógeno y actúa de célula presentadora de antígenos (APC) a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para generar la respuesta inmune adaptativa, siempre que sea necesaria. Esta respuesta inmune tiene como piedra angular a los linfocitos T CD4+ también llamados linfocitos Thelper, como se puede observar en la figura 1.6²⁹.

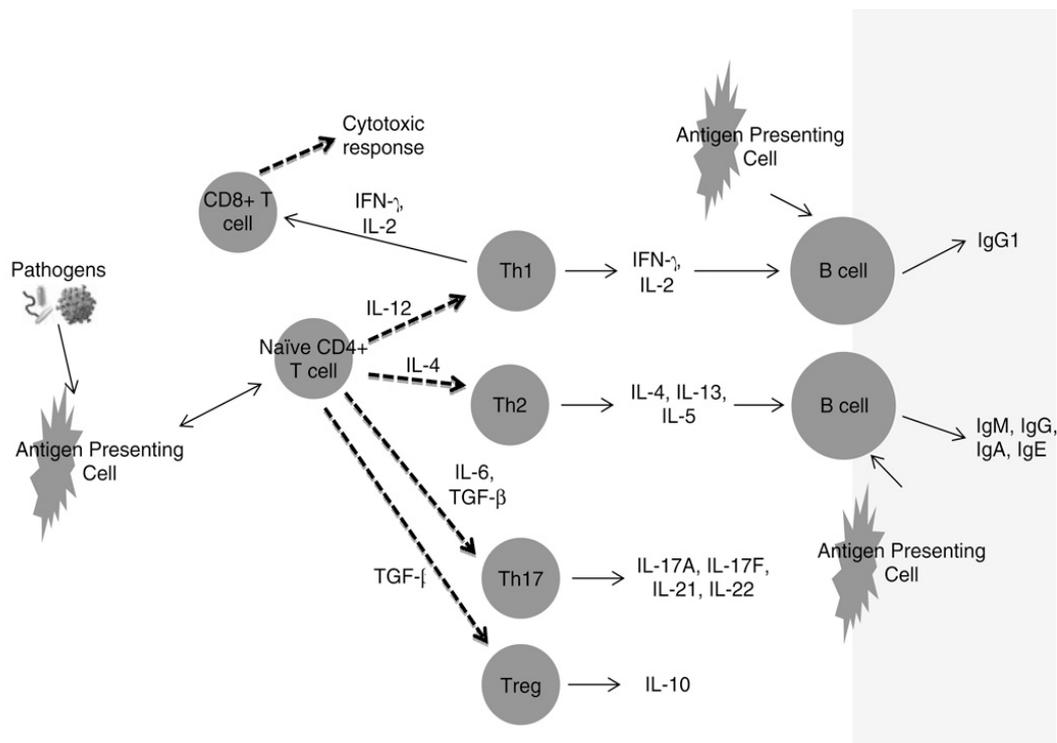


Figura 1.6. Esquema de las funciones desarrolladas por los linfocitos T CD4+²⁹.

Sin los linfocitos T CD4+ el sistema inmune colapsa, no se llevan a cabo las funciones de regulación de la respuesta inmune (linfocitos Treg), ni se da la respuesta inmune humoral (producida por anticuerpos generados por los linfocitos B), ni se produce la activación de células TCD8+. La no regulación de la respuesta inmune puede llegar a generar procesos tumorales linfocíticos, que se agravarían al no tener linfocitos citotóxicos (CD8+) activos. No se podría contrarrestar una infección vírica ya que tanto la respuesta celular como la humoral (linfocitos T citotóxicos y linfocitos B, respectivamente) serían deficitarias. Por lo tanto, el individuo infectado con el VIH, y que

ha llegado a desarrollar la inmunodeficiencia, está a expensas de que se produzca una infección secundaria (secundaria porque viene producida por una primera infección por VIH) que, ésta sí, pueda ser mortal.

Las enfermedades asociadas a la infección por VIH-1 son ampliamente conocidas, el sarcoma de Kaposi, infección por virus del herpes simple (HSV), citomegalovirus (CMV), infección por mycoplasma tuberculosis, etc.^{30,31}.

1.4 Tratamiento del VIH-1

En la actualidad no existe un tratamiento que elimine por completo al virus del organismo ya que, como hemos visto, el material genético del mismo forma reservorios celulares en el organismo.

La prevención se convirtió en un mecanismo para evitar la propagación de la enfermedad, evitar que el virus sea capaz de infectar al individuo, por lo que durante los años 80-90 se puso énfasis en el uso del preservativo para usar el contagio, así como, en los análisis exhaustivos de la sangre en las donaciones y transfusiones, y en sistemas de seguridad en inyectables que impidieran su reutilización. Aún así, en la actualidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se infectan al año 1,8 millones de personas. Existiendo, aproximadamente, 36 millones de infectados. Por lo tanto, la prevención no ha sido el mecanismo más eficaz para frenar la propagación de la infección.

El tratamiento más eficaz actualmente es la llamada terapia antirretroviral altamente activa (HAART en sus siglas en inglés). Consiste en la administración de fármacos activos frente a diferentes moléculas víricas implicadas de manera directa en la replicación viral, como por ejemplo las tres enzimas, retrotranscriptasa, integrasa y proteasa. Este tratamiento reduce la carga viral hasta umbrales no detectables pero su cancelación conlleva el desarrollo vírico, por lo que se produce una cronificación del tratamiento y la enfermedad.

Desde el descubrimiento del virus, su estructura y su mecanismo de infección, se empezaron a diseñar tanto vacunas como fármacos retrovirales. Aquellos medicamentos que se diseñaron enfocados a una de las enzimas de manera muy selectiva tuvieron éxito de inmediato, reduciendo la carga viral de manera muy efectiva. Sin embargo, la prolongación del tratamiento con el mismo fármaco daba lugar a resistencias adquiridas de manera rápida. Esto es debido a que la retrotranscriptasa no tiene un mecanismo de

corrección de errores, presente en otras polimerasas, como las polimerasas humanas. Por ello, al generar la cadena de ADN copia, puede introducir una serie de mutaciones, es decir, de cambios en la secuencia que dan lugar a proteínas víricas diferentes. Obviamente, aquellas mutaciones que afecten a la funcionalidad de las proteínas darán lugar a virus no infectivos. Sin embargo, es posible que las nuevas proteínas que se generen tengan la funcionalidad intacta sin embargo puedan evitar la acción de los fármacos.

De alguna manera, se produce una evolución viral producida por una selección natural de las cepas de los virus presentes en el organismo, dirigida precisamente por el tratamiento. Es decir, aquellos viriones con mutaciones que no resistan la acción de los medicamentos serán eliminados, mientras que los viriones con mutaciones resistentes podrán continuar la infección, provocándose resistencia a la terapia.

Este motivo impulsó el desarrollo de una gama de antirretrovirales amplísima, para poder tener siempre un tratamiento disponible cuando se llevase a cabo la resistencia al primer fármaco suministrado.

El conocimiento del ciclo de infección del virus, generó puntos claros donde intentar atacar e impedir el desarrollo viral, como observamos en la figura 1.4²³.

En la actualidad existen inhibidores de la fijación a CD4 y al correceptor, inhibidores de la fusión, inhibidores de la retrotranscripción, de la integración del virus en la célula, inhibidores de la maduración e inhibidores de la proteólisis de la proteína de la cápsida. Todos ellos forman parte de la terapia HAART³². Ante un caso de infección, el tratamiento comenzaría con un cóctel de varios inhibidores, que toquen varios puntos del ciclo viral, y este tratamiento se irá cambiando a lo largo del tiempo cuando vayan apareciendo resistencias.

Hemos hablado de que la estrategia más efectiva para combatir el VIH es la preventiva y una de las armas más utilizadas para la prevención de enfermedades infecciosas es la vacunación. Por lo que, paralelamente al desarrollo de fármacos retrovirales, se empezó el desarrollo de vacunas capaces de prevenir la infección, así como vacunas que sirviesen de estimulación del sistema inmune una vez que el virus ha conseguido infectar al organismo.

Sabemos que los individuos infectados son capaces de generar cierta cantidad de anticuerpos neutralizantes de la infección, y que esos anticuerpos son capaces de proteger

a ratones humanizados³³ y a primates no humanos^{34,35}. La proteína sobre la que se generan esos anticuerpos es la única proteína vírica expuesta al medio extracelular, la env, formada por gp120 y gp41, por lo que los intentos de generar anticuerpos frente al VIH-1 mediante vacunas hayan sido intentando conseguir partículas de env estabilizadas, solubles y seguras para la administración a personas³⁶. Pero de nuevo existe el problema de la presión evolutiva a la que se ve sometido el virus, ya que genera que, en su superficie, la env presente epítomos no inmunogénicos³⁷. Un ejemplo de este sistema se ve en el desarrollo de unos patrones de glicosilación derivados del huésped, que impide al sistema inmune reconocer al virus como un organismo extraño al que atacar, proporcionando un escudo protector al virión, figura 8b, además de dejar a los epítomos más conservados del virus, ocultos, impidiendo su reconocimiento por anticuerpos.

Además, si se producen anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a gp120 y gp41, el virus es capaz de provocar la disociación del trímero gp120/gp41, generando gp120 libre y gp41 no funcional, esta disociación se llama “shedding”, y se produce durante las primeras etapas de la infección, como desarrollaremos más adelante.

Con este sistema de liberación de gp120, se produce un efecto de “cebo” por el que los anticuerpos producidos frente a gp120 interaccionarían con una molécula soluble que no realiza ninguna misión en la infección, al igual que la gp41 libre en la superficie, interacciona con anticuerpos generados frente a ella, siendo totalmente disfuncional, figura 1.7a.

Todos estos factores han influido en que el desarrollo de una vacuna efectiva haya sido imposible hasta la fecha.

Sin embargo, no todo son malas noticias, existen anticuerpos neutralizantes capaces de penetrar el escudo de glicanos y llegar a epítomos de las proteínas de la env más conservados. Además, el escudo de glicanos no es del todo tolerado por el sistema inmune, siendo capaz de generar anticuerpos neutralizantes que reconocen los glicanos o su estructura, como por ejemplo el anticuerpo 2G12, que reconoce patrones de

oligomanosas³⁸.

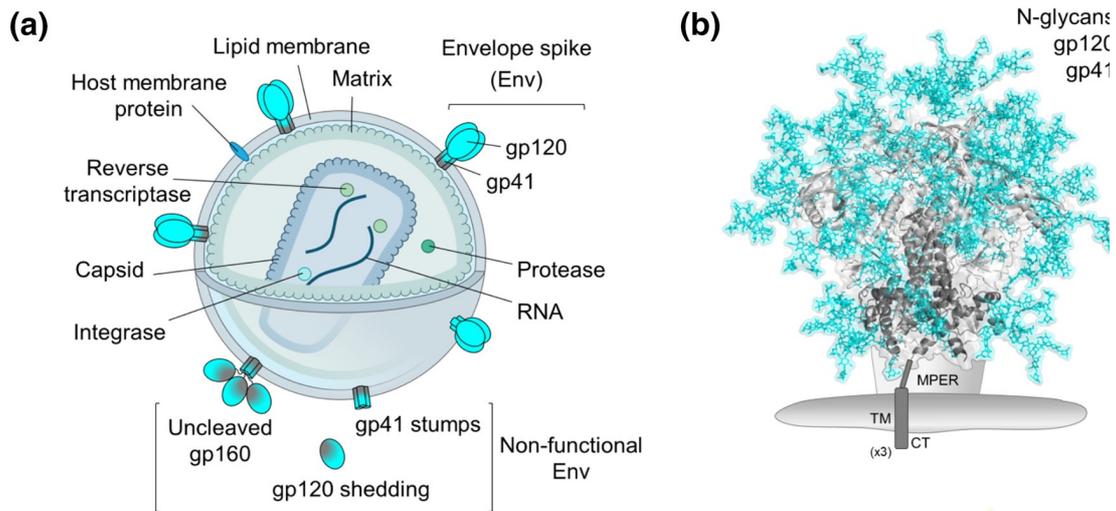


Figura 1.7. Sistemas de defensa de la env del VIH-1³⁵.

También existen vacunas con diferentes estrategias, no solo dirigidas a la obtención de antígenos presentes en la env que se encuentran en diferentes fases clínicas³⁹⁻⁴¹.

1.5 Futuro del tratamiento

Hemos hablado a lo largo del punto anterior porqué es tan complicada la erradicación del virus. La adquisición de resistencia, la disminución de linfocitos Thelper que influyen en la eficiencia de la respuesta inmune, los mecanismos de evasión que tiene el virus frente a la aparición de anticuerpos neutralizantes... Pero sin lugar a duda, el mayor problema radica en la creación de reservorios virales.

En la actualidad, el tratamiento controla la infección y reduce al mínimo los niveles víricos, sin embargo, la interrupción de dicho tratamiento significa la recidiva de la infección. Esto se debe principalmente a la existencia de los reservorios virales. Por lo tanto, la investigación actual se centra en poder localizar y destruir dichos reservorios.

Existen dos teorías que tratan de dilucidar cómo hacer frente a los reservorios virales: “shock and kill” y “block and lock”.

“Shock and kill”: este tratamiento trata de activar la replicación viral del genoma de la célula que se encontraba en unas tasas de replicación basales muy bajas y generar así partículas virales. Este sería el primer paso de la terapia, “shock”. Para reactivar la transcripción se usarían fármacos como inhibidores de desacetilasas de Histonas

(DHAC), inhibidores de metiltransferasas (HMT), agonistas de la protein Kinasa C (PKC), todas ellas moléculas implicadas en el proceso de transcripción. Las histonas acetiladas se encuentran presentes en las regiones de ADN que se tiene una transcripción elevada, por lo que inhibiendo las enzimas que desacetilan las histonas impediríamos la represión de la transcripción. Lo mismo sucede con los grupos metilo en las histonas o el ADN, estos grupos metilos provocan un mejor empaquetamiento del genoma impidiendo la transcripción, por lo tanto, inhibiendo a las moléculas que provocan la metilación estamos favoreciendo la transcripción.

Una vez que el virus se está replicando de nuevo, necesitamos la segunda parte de la terapia “kill”, se ha pensado que el efecto citopático del virus sería suficiente para llevar a cabo la muerte celular, pero se ha visto que no es del todo efectivo. Algunas proteínas del virus como *tat* y *vpr*, expresadas en un momento concreto del ciclo viral, favorecen las señales de supervivencia celular, por el contrario, otras proteínas víricas como *vpu* o *env*, pueden señalar rutas de apoptosis. Esto genera un balance de señales pro y anti-apoptóticas que deja en el aire la muerte o supervivencia celular. Es por ello, que se plantea que en el tratamiento se incluyan moléculas que favorezcan la apoptosis y lleven a la muerte celular.

Cabe mencionar que los viriones generados al reactivar la replicación viral serán eliminados por la terapia antirretroviral convencional⁴².

Esta teoría se resume de manera sencilla en la figura 1.8.

Este tratamiento tiene sus limitaciones y aunque in vitro ha mostrado efectividad es necesario seguir con estudios más exhaustivos.

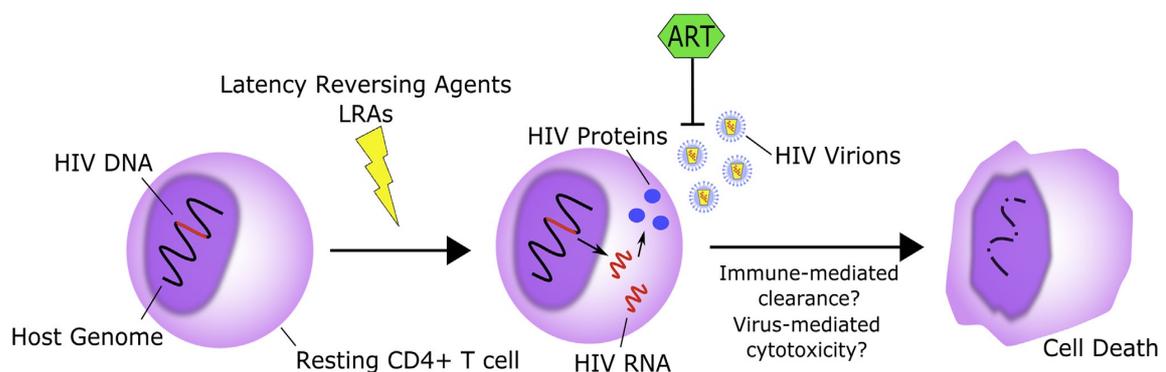


Figura 1.8. Representación del tratamiento “shock and kill”⁴⁰

“**Block and lock**”: este tratamiento trata de, durante la infección primaria, eliminar la posibilidad de generación de reservorios, además de reducir la generación de nuevos reservorios una vez se están produciendo nuevos viriones mediante el “shock and kill”. Como ya hemos mencionado, para la integración del virus, la integrasa viral interacciona con la proteína celular LEDGF/p75, que reconoce las regiones del genoma con alta tasa de replicación. Por lo tanto, al usar inhibidores que bloqueen esta interacción (LEDGIN), el genoma viral se integrará de manera aleatoria en el genoma, en regiones que no son transcritas, además de poder hacerlo en una orientación no favorable, es decir, en vez de de 5'→3', en el sentido opuesto 3'→5', impidiendo una transcripción favorable. De esta manera bloqueamos y cerramos la capacidad de formar reservorios. Para asegurar este bloqueo de la replicación también se están usando inhibidores capaces de impedir la acción de *tat*, proteína implicada en la activación de la replicación del ADN viral, figura 1.9⁴³.

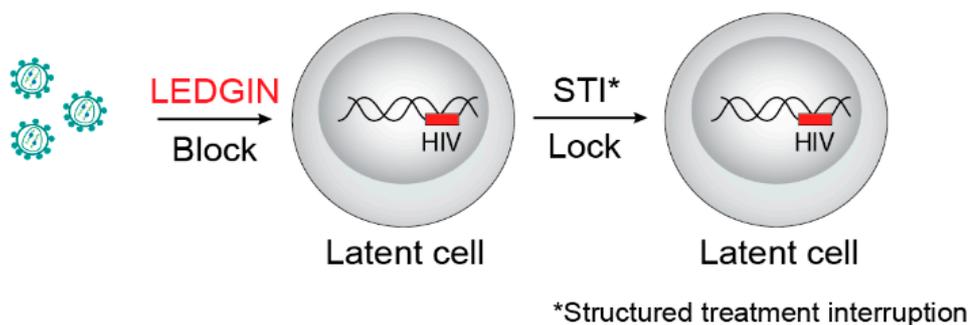


Figura 1.9. Representación tratamiento “block and lock”⁴¹

Estos dos nuevos tratamientos por sí solos no serán capaces de resolver el problema de la integración del genoma viral y la formación de reservorios virales, pero abren la puerta a nuevas investigaciones, así como focalizan hacia donde dirigir el punto de vista de investigaciones para futuros tratamientos de los reservorios.

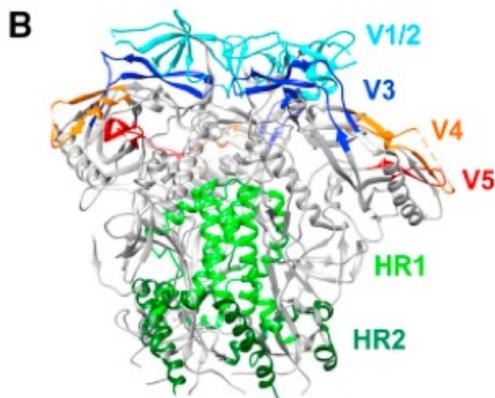
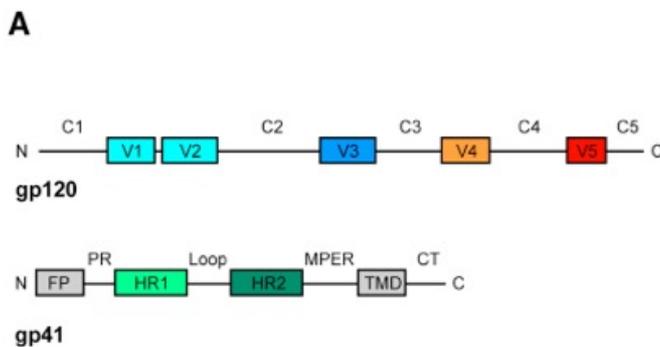
1.6 ENV y los primeros pasos de la infección

Durante el ciclo de infección hemos explicado como se produce de manera resumida la interacción entre las proteínas de la *env* y el receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4. Este evento de la infección es extremadamente importante, ya que, si impedimos que el virus penetre en la célula, evitaríamos la infección. Este trabajo se focaliza en el

estudio de esta etapa, centrándose sobre todo en la proteína gp41, es por ello por lo que desarrollaremos este tema más profundamente.

La env es la única proteína viral que se encuentra en la membrana viral. Es está formada por una proteína precursora, gp160, que sufre un corte proteolítico durante su maduración en el aparato de Golgi, más concretamente en el trans-golgi⁴⁴. Esta proteólisis genera dos proteínas, la gp120 y la gp41, que permanecen interaccionando de una manera no covalente. Este heterodímero llega a la superficie celular durante los últimos pasos del ciclo de infección y trimeriza cuando se produce la generación del virion.

Como ya hemos visto, la gp120 es la proteína de superficie (SU), que envuelve y oculta a la gp41 (TM), la cual se encuentra anclada en la membrana viral^{10,11}.



En la figura 1.10A se representan los diferentes dominios de las proteínas gp120 y gp41, mientras que en la figura 1.10B vemos representada la estructura de la región extracelular de la env. La gp41 está representada en verde, mientras que en la gp120 las regiones constantes C1-C5 se representan en tonos grises, y las regiones variables V1-V5 con colores diferentes⁴⁵. En esta representación no se muestran los puntos de glicosilación ni los glúcidos que forman el escudo que protege a la proteína de la acción de los anticuerpos.

Si nos fijamos en la gp120, su estructura se divide en dos grandes dominios, un dominio interior (inner domain), representado en gris en la figura 1.11, y un dominio exterior (outer domain).

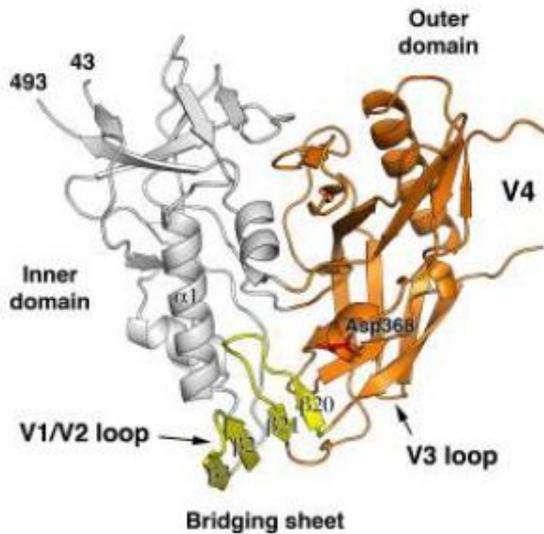


Figura 1.11. Representación cintas de la organización en dominios de gp120.

El dominio exterior está formado principalmente por un doble barril β , mientras que el dominio interior, está formado principalmente por 3 hélices- α y 7 regiones en β -sándwich. En el outer domain se encuentran las regiones variables, V1-V5, que están altamente glicosiladas. Además, es en las regiones V1/V2 donde se encuentra el sitio de alta afinidad por CD4. El inner domain está formado por las 5 regiones más conservadas de la secuencia de aminoácidos de la gp120, C1-C5, y es en la C5 donde se encuentra el punto de interacción con gp41.

La gp41 presenta varios dominios en su secuencia de aminoácidos. Si comparamos la figura 1.12 con el esquema de la secuencia de la figura 1.11, el dominio HR1 o NHR, llamado así porque está formado por hepta-repeticiones de una secuencia conservada que le otorga estructura de α -hélice, corresponde a la región coloreada en azul (α 7) y en verde oscuro (α 6).

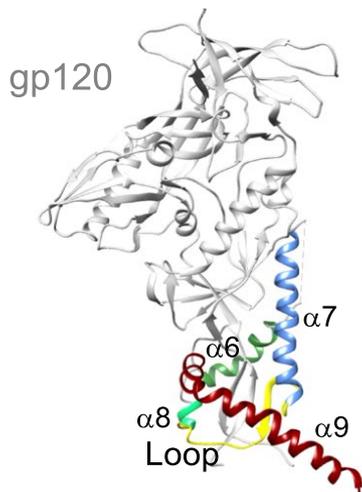


Figura 1.12. Representación de un heterodímero gp120 (gris), gp41 (coloreado)⁴⁶.

Esta estructura en α -hélice se ve interrumpida por un lazo (amarillo) que se forma entre aminoácidos hidrofóbicos presentes la secuencia. El lazo forma un collar donde se inserta la región C5 de la gp120. Además, presenta la secuencia que conecta la primera región de hepta-repeticiones (NHR) con la segunda (CHR). La región CHR está representada por la hélice verde claro $\alpha 8$ y la roja $\alpha 9$. Esta estructura se observa antes de que se hayan desencadenado los primeros eventos de la fusión, es pre-fusogénica.

Cuando la gp120 reconoce al receptor CD4 e interacciona con él mediante V1/V2, su conformación cambia a una más abierta. La morfología de los lazos varía dejando accesible el sitio de unión al correceptor. La unión con CD4 provoca un cambio en la posición de V3, proyectándolo hacia su diana, el correceptor. El virus tiene tropismo por dos correceptores CCR5 ó CXCR4. El correceptor es una proteína con siete regiones transmembrana, unidas mediante lazos, algunos de los cuales se encuentran en el interior celular y otros en el exterior. Es en el segundo lazo del correceptor donde se produce la interacción con V3. Esta segunda unión desencadena la exposición de la región de gp41 llamada péptido de fusión (FP) figura 1.10, que se fija a la membrana celular. El que se desencadene correctamente esta serie de eventos es fundamental, ya que es misión de la gp41 finalizar de manera exitosa la fusión. De hecho, se conocen individuos que son resistentes a la infección por VIH-1. Estas personas tienen una mutación en la secuencia del receptor CCR5, más concretamente una deleción, esta mutación se conoce como CCR5- $\delta 32$. La deleción afecta a la región del correceptor donde interacciona gp120, de

forma que el correceptor no tiene la secuencia de unión, impidiendo que se desencadenen los siguientes pasos de la fusión y haciendo imposible la infección⁴⁶.

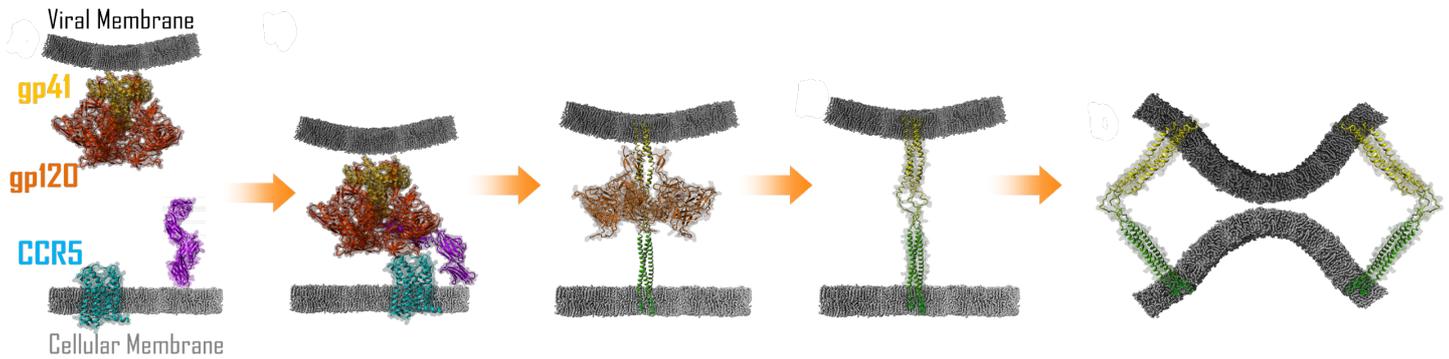


Figura 1.13. Esquema de los eventos de fusión entre la membrana viral y la membrana celular mediados por gp120 y gp41.

Volviendo al mecanismo de fusión, una vez que el correceptor interacciona con gp120 y se lanza el péptido de fusión de la gp41 hacia la membrana celular, la estructura de gp41 cambia drásticamente. Toda la región NHR adopta estructura en α -hélice. Cuando esto ocurre, la región CHR es capaz de interactuar con la primera generando un manojo de seis α -hélices (6HB) que facilita la aproximación de la membrana viral y celular, y la mezcla fosfolipídica, figura 1.13 y 1.14⁴⁷⁻⁴⁸.

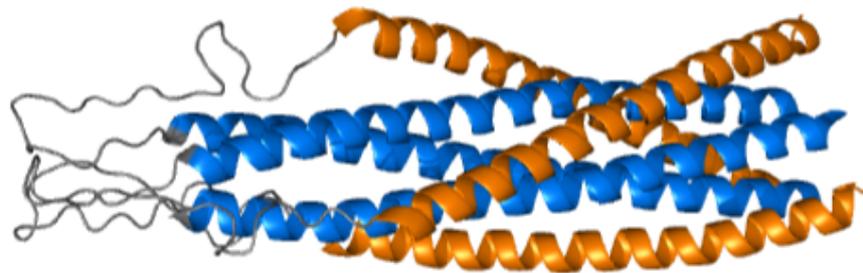


Figura 1.14. Representación del manojo de 6 hélices (6HB), en azul se representa NHR y en naranja CHR, en gris se definen los lazos que unen ambas regiones⁴⁸.

En las hepta-repeticiones existen aminoácidos hidrofóbicos conservados en las posiciones 1^a y 4^a de cada repetición, conocidas como *a* y *d*⁴⁹, figura 1.15. Las cadenas laterales de estos aminoácidos interactúan en las α -hélices de NHR formando un *core* hidrofóbico y generando el trímero NHR. Mutaciones en las regiones *a* y *d* de esta estructura pueden distorsionar la formación del trímero al no producirse los contactos hidrofóbicos correctos⁵⁰.

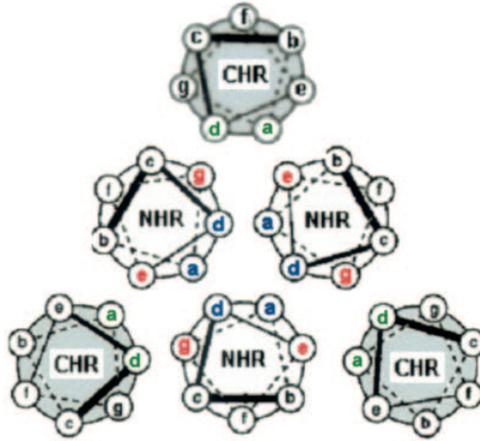


Figura 1.15. Esquema de interacción entre NHR-CHR y los aminoácidos implicados en dicha interacción⁴⁹.

Además, los aminoácidos *a* y *d* de las secuencias CHR son los implicados en la interacción con las posiciones *e* y *g* de NHR. Un cambio en la secuencia hidrofóbica de dichos aminoácidos implica una pérdida de afinidad, impidiendo una unión eficiente. Además, mutaciones en las posiciones *e* y *g* de CHR pueden afectar a la afinidad de la interacción⁵¹. El surco de interacción de NHR, donde se posiciona CHR tiene unos puntos de unión altamente conservados. El principal es el llamado bolsillo hidrofóbico, una cavidad profunda donde interaccionan aminoácidos hidrofóbicos de CHR, dos triptófanos y una isoleucina, que forman el dominio de unión al bolsillo o “pocket binding domain” (PDB)^{49,51}. Este bolsillo hidrofóbico se encuentra muy conservado ayudando a estabilizar la estructura 6HB y adquiriendo una notable relevancia en los eventos de fusión, por lo que se considera una buena diana para el diseño de compuestos inhibidores de fusión.

Los cambios exactos que se producen una vez interaccionan gp120 con el correceptor, y las variaciones estructurales que sufre gp41 para acabar formando el 6HB, estado post-fusión, no son conocidos todavía. Lo que se tiene claro es que la fusión tiene una termodinámica favorable, por lo que para la mezcla lipídica se requiere una gran cantidad de energía, que se consigue mediante la interacción de NHR y CHR.

Otro factor a tener en cuenta son el número de *env* necesarias para que se pueda llevar a cabo la mezcla lipídica. El número exacto no es conocido, aunque se postula que debe haber un umbral mínimo por debajo del cual los viriones no tendrían capacidad infectiva. Sí parece claro que sería necesario el anclaje de varias *env* a varios receptores/correceptores para que se produzca la fusión, figura 1.16.

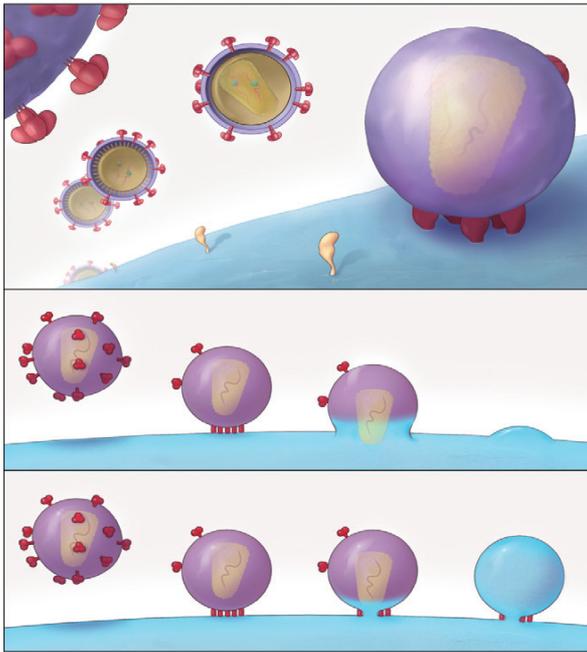


Figura 1.16. Representación del número de *env* que provocan la fusión⁴⁴.

Por lo que sabemos hasta ahora, la *env* tiene un gran atractivo como diana terapéutica, no solo para la obtención de vacunas que generen anticuerpos que lleguen a neutralizar la infección, sino también para el desarrollo de fármacos capaces de inhibir la fusión mediante el bloqueo de algunos de los pasos explicados en este apartado.

Desde que se descubrió el mecanismo de infección y el proceso de fusión del virus se han probado diversos tipos de inhibidores de fusión. Algunos interaccionan con la proteína gp120, actuando como miméticos de CD4, como CD4 soluble que provoca la exposición de regiones de la ENV que estaban ocultas, así como el shedding o desprendimiento de gp120 de gp41⁵². Otras moléculas interaccionan con el correceptor CCR5, como maraviroc, evitando su unión. Además, se han desarrollado moléculas pequeñas, anticuerpos (2F5, 4E10) e incluso péptidos (T20 ó enfuvirtide), que interaccionan con la proteína gp41⁵³⁻⁵⁵. Todos ellos frenan la infección y el desarrollo de la enfermedad, pero ninguno erradica por completo al virus.

Sin embargo, parece que estudiar este punto clave en la etapa de infección puede llegar a dar con la solución a la infección, por lo que el desarrollo de nuevas moléculas que permitan conocer mejor cómo se llevan a cabo estos pasos de fusión, además de poder servir por sí mismas como agentes inhibidores de la fusión, es una de nuestras metas.

1.7 Sistemas miméticos de gp41

El cambio conformacional que conduce a la interacción entre los dominios NHR-CHR de gp41 durante el proceso de fusión se conoce muy poco. Sin embargo, gracias a la resolución de la estructura de ENVs cristalizadas o usando técnicas como Cryo-EM^{45,48}, se conocen las estructuras pre- y post-fusión de la proteína. Esta noción facilitó el diseño de compuestos pequeños que impidieran la interacción NHR-CHR y, más adelante, el diseño de péptidos relativamente cortos que imitaran la secuencia de aminoácidos de algunas de las regiones NHR o CHR, con el fin de unirse con su región diana complementaria impidiendo la asociación NHR-CHR en la *env* del virus.

Aquellas moléculas o péptidos que tienen una secuencia mimética a CHR se llaman inhibidores de clase I, e interaccionan con cavidades sobretodo hidrofóbicas presentes en la región NHR. Entre esta clase de inhibidores se encuentra el único péptido aprobado por la FDA como fármaco inhibidor de la fusión, el T20 o enfuvirtide⁵³, aunque existen otras moléculas que están siendo estudiadas para el mismo propósito, como el sifuvirtide⁵⁶. El mayor problema de enfuvirtide es la alta tasa de mutación que genera en la región NHR, creando cepas resistentes al fármaco⁵⁷. Además, de la alta dosis que requiere, debido a su bajo peso molecular y por ende su rápido aclaramiento renal. El T20 tiene una vida media de 4h en sangre, es muy susceptible a proteólisis y su reducido tamaño facilita su eliminación del organismo. Por ello la dosis necesaria son 90mg dos veces al día, lo que encarece el tratamiento. Su modo de administración debe ser evitando la vía oral, ya que se hidrolizaría con las proteasas del estómago y el intestino, generando molestias al tener que inyectarse de manera intravenosa o subcutánea. Todos estos inconvenientes provocan que el tratamiento con este fármaco esté en desuso.

Las moléculas que mimetizan la secuencia NHR, intentando interaccionar con CHR son inhibidores de clase II. El mayor problema que tienen estos péptidos es su auto asociación debido a la presencia de regiones hidrofóbicas que generan oligomerización e inactivación de la funcionalidad. Sin embargo, construcciones que permiten la trimerización del péptido mediante dominios triméricos⁵⁸, o el diseño de proteínas como 5-helix⁵⁹, que simula en una única cadena polipeptídica la estructura estable 6HB post-fusión de la gp41 eliminando una de las hélices CHR para crear una región de interacción, han conseguido mejorar su producción y rendimiento. Sin embargo, ningún inhibidor de clase II ha sido aprobado como tratamiento.

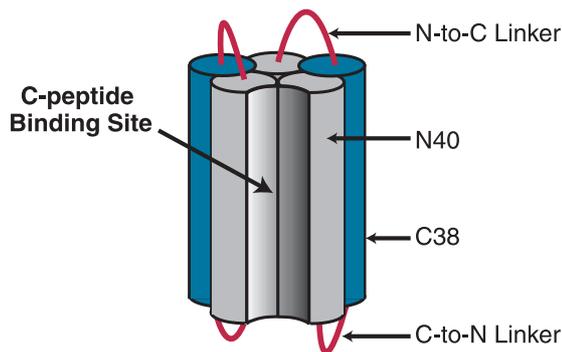


Figura 1.17. Representación de la estructura de 5-hélice⁵⁵.

Aunque el uso de fármacos de tipo peptídico es casi nulo como inhibidores de fusión, su desarrollo ha permitido el estudio del mecanismo de fusión del virus. Además, ha servido para intentar postular los cambios estructurales que podría sufrir gp41 durante los eventos de la fusión, teniendo en cuenta las dianas para las que están diseñados los péptidos, y en qué momento de la fusión esas dianas estarían accesibles para los inhibidores.

Gracias, por ejemplo, al T20, se deduce que después de la interacción de gp120 con el receptor y el correceptor, sin haberse producido la fusión completa, existe un momento en el que la región trimérica NHR expone los puntos de interacción a T20. Sin embargo, esa estructura es inestable y transitoria, ya que dependiendo del momento de la fusión en el que añadamos el T20, presentará o no inhibición a la replicación viral, además del reducido tiempo de acción que posee, como mucho 1h ⁶⁰.

1.8 Proteínas covNHR

Todos los motivos expuestos anteriormente llevaron al grupo dirigido por el Dr. Conejero-Lara al diseño de proteínas miméticas del trímero NHR. La característica principal de estas moléculas es su ingeniosa estructura. El trímero de NHR en condiciones nativas en la *env* está formado por tres α -hélices paralelas que interaccionan entre sí, mientras que las proteínas diseñadas por Conejero-Lara, son una única secuencia polipeptídica que contiene una de las α -hélices en orientación antiparalela, hélice B de la figura 1.18, con respecto a las otras dos, lo que permite ligar las tres hélices con segmentos cortos de 3 ó 4 aminoácidos. Además, se realizaron una serie de mutaciones puntuales en la secuencia original de NHR, que permitieron la creación de puentes salinos e interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura de la proteína, y así obtener una

alta solubilidad. Sin embargo, al tener una de las hélices en sentido opuesto al original, dos de las tres superficies de interacción que presenta el trímero no tienen una morfología que permita una unión con la región diana CHR similar a la nativa, aunque sí permitiría una unión de tipo 1:1 con una hélice CHR, figura 1.18. A estas proteínas se les dio el nombre de covNHR, cov- por covalentes, y NHR por la región que mimetizan⁶¹.

Estos diseños, al tratarse de proteínas y no péptidos, tienen como principal ventaja la capacidad de ser producidos mediante tecnología recombinante en bacterias, lo que permite un mayor rendimiento en la producción, ya que se puede escalar a una producción industrial, abaratando los costes de producción. Además, no necesitan modificaciones postraslacionales y químicas para estabilizar su estructura. Si lo comparamos con construcciones como 5-Helix, la ventaja radica en una reducción del tamaño molecular, importante para la actividad inhibitoria, ya que el tamaño puede influir en la capacidad de interacción con su diana. Por lo general, una molécula de mayor tamaño podría presentar dificultades para acceder e interactuar con su diana molecular.

Se llevaron a cabo diferentes diseños, la primera proteína covNHR diseñada, covNHR1, no llegaba a expresarse, por lo que se realizaron una serie de mutaciones que eliminasen aminoácidos hidrofóbicos de la superficie expuesta al disolvente, cambiándolos por aminoácidos polares que pudieran formar interacciones electrostáticas entre ellos. De esta manera, la proteína adquiriría características más hidrofílicas, además de ganar en estabilidad. La proteína diseñada con estas modificaciones, covNHR2, sí pudo producirse, y a partir de ella se diseñó una tercera proteína, covNHR3, con lazos que conectaban las hélices miméticas NHR de mayor longitud. Tanto covNHR2 como covNHR3 tenían cierta propensión a la auto asociación. Sin embargo, covNHR3 presentaba una entalpía de desplegamiento mayor, así como mayor cooperatividad en la desnaturalización, por lo que se deducía una estructura terciaria más organizada. Por lo que se prosiguió con la mejora de la estructura de esta proteína.

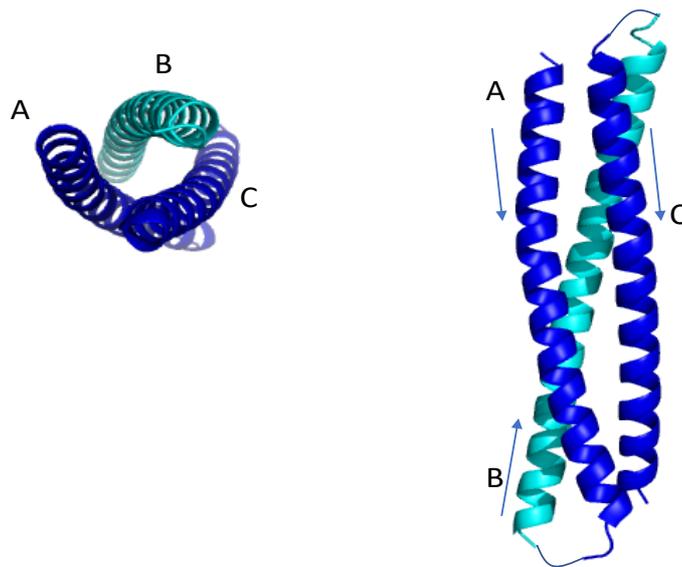


Figura 1.18. Representación esquemática de la topología de las proteínas covNHR. En azul se indican las hélices A y C paralelas, y en cian la hélice invertida en conformación antiparalela. Las flechas marcan la orientación de la hélice.

Aparte de la superficie de interacción entre las dos hélices NHR paralelas, similar a la presente en la estructura del trímero NHR nativo, tanto covNHR2 como covNHR3 presentaban dos regiones adicionales en las superficies de interacción no-nativas entre las hélices antiparalelas, que podían estar causando uniones inespecíficas con péptidos CHR, así como provocando la auto asociación. Por esta razón, en una siguiente generación de proteínas derivadas de éstas, se mutaron las secuencias para rellenar varias cavidades de esas superficies de interacción, llegando finalmente al constructo covNHR3-ABC, que pudo ser cristalizado para su determinación estructural y comparado con la estructura pos-fusión de gp41, figura 1.19. En ella se ve un gran mimetismo con la región NHR de la estructura 6HB. Además, covNHR3-ABC presenta una alta afinidad por péptidos de la región CHR como el C34, y una buena actividad de inhibición de la replicación de diversas cepas de VIH-1 en ensayos estandarizados in vitro.

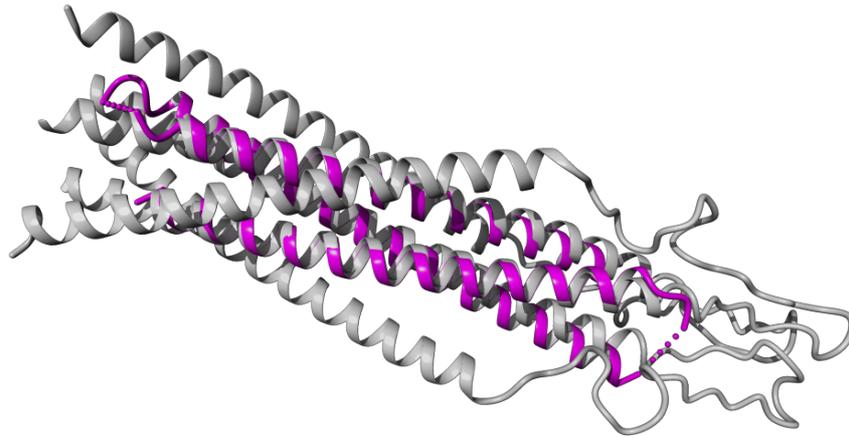


Figura 1.19. Superposición de la estructura cristalizada de covNHR3-ABC (rosa) (PDB:4R61) con la teórica estructura pos-fusión de gp41, PDB:1IF3.

1.9 Hipótesis y objetivos

Con estos antecedentes, el objetivo principal de esta Tesis es el de continuar con un estudio termodinámico-estructural más completo de las proteínas covNHR, que nos permita desentrañar de manera más precisa las diferentes regiones de interacción con CHR y los factores termodinámicos y estructurales que los gobiernan. Esto nos ayudará en el diseño de nuevas proteínas que puedan ayudar a esclarecer los mecanismos de inhibición de estas moléculas, así como a la obtención de un posible inhibidor de la fusión que mejore al único fármaco hasta ahora aceptado para el tratamiento frente a la infección por VIH-1.

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización biofísica, termodinámica y funcional de 6 variantes miméticas de la región NHR de gp41. Se ha estudiado la capacidad de producción y purificación, sus propiedades biofísicas, como estructura, tamaño molecular y estabilidad. Además, se ha analizado la termodinámica de interacción con sus secuencias diana en CHR y, por último, su capacidad de interacción con viriones ó estructuras ENV nativas, y su actividad de inhibición de la infección viral.

En un primer lugar, se han caracterizado covNHR3-ABC y un doble mutante derivado, covNHR-VQ, estudio descrito en el capítulo 3. Este nuevo mutante ha permitido una caracterización extensa de la interacción con diferentes péptidos derivados de CHR, que

nos ha permitido diseccionar la molécula según sus diferentes regiones de interacción, resultados que se describen en el capítulo 4. Conocer dichas zonas de contacto ha favorecido el diseño de moléculas de menor tamaño que contienen diferentes regiones diana de CHR, con el objetivo de aumentar la capacidad de accesibilidad de las proteínas a sus objetivos, dichos resultados se encuentran descritos en los capítulos 5 y 6.

CAPITULO 2:

Materiales y Métodos

2.1 Producción y purificación de las proteínas

2.2.1 Secuencias de las proteínas

Todas las variantes estudiadas fueron diseñadas mediante programas de diseño molecular, como Accelrys Discovery Studio, Yasara ó SwissPDBviewer. Todas ellas se diseñaron con las siguientes propiedades similares:

- Los lazos que conectan las regiones estructuradas en α -hélice se diseñaron tratando de crear motivos tapadera de las hélices e interacciones favorables con cadenas laterales de aminoácidos adyacentes. Además, se incluyeron glicinas que aumentan la libertad conformacional necesaria para que el plegamiento correcto pueda llevarse a cabo.
- Que presenten al menos un grupo cromóforo que nos permitan su cuantificación mediante técnicas espectrofotométricas.
- Una extensión de 6 histidinas en el extremo N o C-terminal que ayuden en su purificación.
- Un punto isoeléctrico (pI) > 9 . Permitiendo que tengan carga neta, en este caso positiva, a pH fisiológico, favoreciendo la solubilidad en ese rango de pH e inferior. Esta propiedad también es de gran utilidad en la purificación, ya que nos permite usar cromatografías de intercambio catiónico que contengan resinas con cargas negativas que permitan la interacción con las proteínas.

Una vez obtenida la secuencia de la nueva proteína de acuerdo con los requisitos de diseño, se encargó la síntesis del ADN codificante de cada secuencia a la empresa GENEART, (Thermo Fisher, CA).

Una vez terminada la etapa de síntesis del gen y el clonaje en el vector de expresión, en nuestro caso el plásmido pET303, ampliamente utilizado en la producción de proteínas recombinantes mediante *E.coli*, cada vector pasó por una etapa de control de calidad y fue enviado a nuestro laboratorio.

2.2.2 Pruebas de expresión

Al llegar cada plásmido liofilizado al laboratorio, se realizaron pruebas de expresión para encontrar el mejor protocolo de producción, con el fin de obtener un mayor rendimiento. Primeramente, se realizó la transformación de bacterias competentes *E.coli* BLR (DE3) y BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt, GE). El protocolo usado para la transformación es el detallado por la empresa Novagen, basado en generar un choque térmico que desestabilice las membranas de las bacterias permitiendo la adquisición del plásmido. Una vez finalizado el protocolo de transformación, las bacterias transformadas se sembraron en placas Petri con medio LB-Agar con 50 µg/mL de Ampicilina, permitiendo crecer aquellas bacterias que hayan adquirido el plásmido con el gen de resistencia Amp. Se incubaron O/N (*over night*) a 37°C y al día siguiente se observó si habían crecido colonias bacterianas.

Normalmente, si la transformación había sido efectiva, se obtuvieron un gran número de colonias, cada una de ellas crecidas a partir de una sola bacteria transformada. Cada colonia nos permitirá estudiar una condición diferente.

En las pruebas de expresión se variaron diferentes condiciones:

- **Temperatura de producción.** Es importante saber que la temperatura a la que las células crecen (37°C) puede no ser la mejor temperatura de producción, por eso es preferible probar a descender esa temperatura sobre los 25-27°C.
- **Concentración del agente inductor.** Aunque parezca lógico pensar que, al aumentar la concentración de agente inductor, en nuestro caso IPTG, tendría que aumentar la producción, este hecho no siempre ocurre, ya que es posible que la sobre estimulación de la producción perjudique el metabolismo celular de la bacteria de manera que se vea reducida la viabilidad celular, reduciendo la masa bacteriana y por lo tanto disminuyendo el rendimiento de la producción.
- **Tiempo de inducción.** Precisamente y derivado del apartado anterior, en algunos casos, debido a la toxicidad producida por la producción de la proteína, un tiempo corto de producción, por ejemplo 4 horas, puede llegar a tener un mayor rendimiento que un tiempo más largo, como O/N.
- **Presencia de la proteína.** También es importante conocer el espacio subcelular en el que se encuentra la proteína una vez se ha llevado a cabo la producción. La sobreexpresión originada en algunas condiciones puede originar un mal plegamiento de la proteína asociado a insolubilidad y por lo tanto a la formación de depósitos insolubles llamados cuerpos de inclusión (IB) en los que se encontraría la proteína. La aparición de los IB no siempre está asociada con

sobreexpresión y mal plegamiento. Algunas proteínas, como las proteínas de membrana, son insolubles en condiciones fisiológicas por lo que se producirán en cuerpos de inclusión. Una proteína insoluble durante su producción se puede purificar usando condiciones desnaturizantes durante toda la purificación, empleando agentes caotrópicos como Urea 8M o guanidina 6M, el problema radica en si la proteína será capaz de renaturalizarse al eliminar el agente caotrópico. Por este motivo, en caso de que en una condición determinada encontremos un rendimiento aceptable en la fracción soluble (FS) de la bacteria, se elegirá esta condición de producción, ya que en esta fracción celular la proteína es más probable que se encuentre plegada.

En las proteínas diseñadas en este trabajo las condiciones que se probaron fueron:

- Temperatura de producción 27 o 37 °C.
- Concentración IPTG: 0,1 y 0,5 mM.
- Tiempo de inducción 4h ó O/N.

Protocolo

- De la placa de LB-Agar que contiene las colonias transformadas con el vector de expresión se selecciona una colonia individual y se inocula en un Erlenmeyer de 50 mL que contiene 12,5 mL de LB-Amp 50µg/mL. Se inoculan tantas bacterias como condiciones se ensayen.
- Los cultivos se dejan crecer hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,6-0,9. Esta densidad marca la fase exponencial del crecimiento bacteriano.
- Una vez alcanzada la OD₆₀₀, se toma una muestra como control negativo de la producción (C-), y se induce con IPTG, según las concentraciones que se quieren probar. Y se baja la temperatura en aquellos cultivos seleccionados para crecer a 27°C.
- A las 4 h de inducción se recogen los cultivos seleccionados y se guardan a 4°C para detener su producción.
- El resto de cultivos se dejan crecer O/N a la temperatura deseada.
- Al día siguiente, se centrifugan todos los cultivos durante 20 min a 4000 g y 4°C para recoger las células y eliminar el medio.
- El pellet celular se resuspende en tampón de lisis celular, Tris 50mM, NaCl 500mM, β-mercaptoetanol 1mM pH 7,5.

- Las células resuspendidas se rompen mediante ultrasonidos, sonicando en ciclos cortos de 30 s.
- La FS se separa de los IB mediante centrifugación 30 min a 14000xg y 4°C.
- Los IB se resuspenden en tampón Tris 50 mM, 500 mM NaCl, Urea 8M, 1mM Gly y pH 7,5
- Mediante ensayo BCA (ácido bicinonínico) se iguala la concentración de proteína total de cada condición ensayada con el fin de poder relacionar la intensidad de la banda en la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) con el nivel de producción.
- Finalmente se desarrolla la electroforesis.

Para todas las proteínas producidas, la condición óptima de rendimiento en el que una amplia cantidad de proteína se encentra de forma soluble fue:

Temperatura 27°C, 0,5 mM [IPTG] y O/N

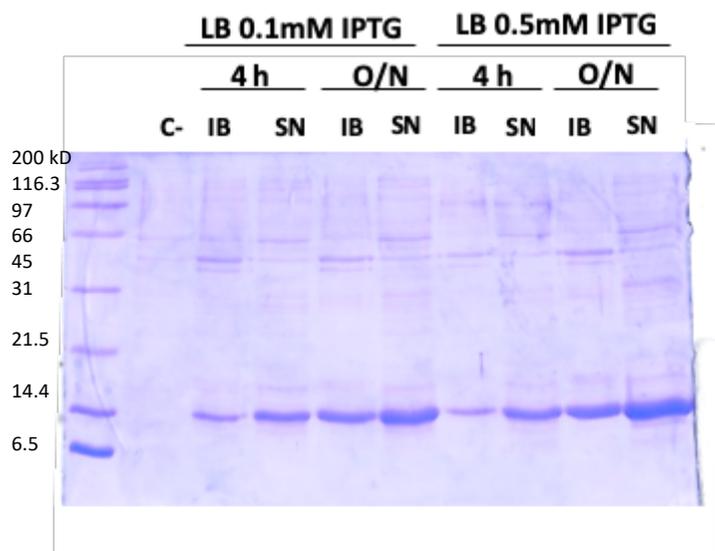


Figura 2.2. Prueba de expresión de una de las proteínas diseñadas.

La figura 2.2 muestra la PAGE-SDS correspondiente a un ejemplo del resultado final de la prueba de expresión. En ella se observa como la intensidad de la banda de la proteína es mayor en la condición antes mencionada.

Una vez teníamos claro qué condición de producción usar, pasamos a la purificación de la proteína aumentando el volumen del medio de producción. Mínimo 1L máximo 5L de LB-Amp.

2.2.4 Producción y purificación de proteínas

En este paso de producción, se crecen las células a 37°C hasta la OD₆₀₀ antes mencionada, y se induce la expresión con una concentración de 0,5 mM de IPTG, descendiendo la temperatura a 27°C y dejando la producción O/N.

Al día siguiente se recogen las células separándolas del medio mediante centrifugación, 6000 g, 10 min y 4°C. El pellet celular se resuspende en tampón de lisis y se sonica para romper la membrana celular con ciclos de 2 min. Una vez finalizada la homogeneización, se separan la FS y los IB mediante ultracentrifugación, a 231333 g, 30 min y 4°C. Los restos celulares se desechan y con la fracción soluble se lleva a cabo la purificación mediante dos pasos de cromatografía.

En primer lugar, se utiliza una cromatografía de afinidad Ni²⁺-NTA, usando las columnas Histrap FF (GE Healthcare, Freiburg, GE). Estas columnas contienen una resina afín al imidazol, el grupo radical presente en las cadenas laterales de las Histidinas. Por lo tanto, de las proteínas presentes en la FS, serán las nuestras las que interaccionen con mayor afinidad con la resina, quedando retenidas en ella. Tras sucesivos lavados, solo al incrementar la concentración de imidazol presente en el tampón de elución obtendremos la elución de la proteína. Para el desarrollo de esta cromatografía, los tampones utilizados son:

- Tampón A: Tris 50mM, NaCl 500mM, pH 7.4
- Tampón B: Tris 50mM, NaCl 500mM, Imidazol 500mM, pH 7.4

La cromatografía se realiza con el equipo FPLC AKTA prime (GE healthcare), mediante saltos de concentración incrementando la concentración de imidazol, 50mM, 100mM y por último 300mM (concentración con la que eluyen las proteínas). De cada condición de lavado y de las diferentes fracciones recogidas durante la elución, se recoge una muestra para comprobar el grado de pureza mediante PAGE-SDS. El resultado de dicha electroforesis se puede ver en la figura 2.3

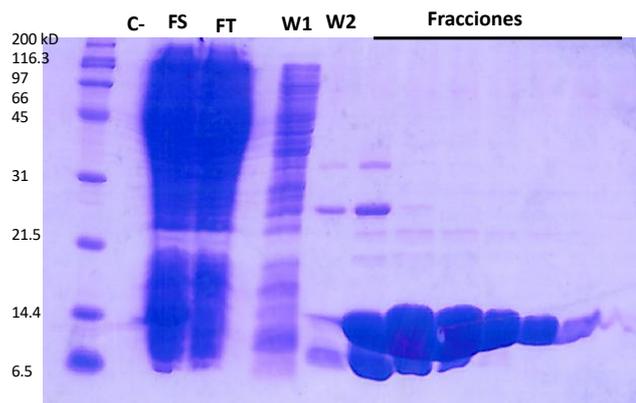


Figura 2.3 PAGE-SDS resumen de la cromatografía de Ni-NTA de una purificación de covNHR

Las fracciones se mezclan y se prepararan para un segundo paso de purificación, ya que como podemos observar, aunque el proceso de purificación ha sido bastante efectivo, las fracciones todavía presentan un grado de impurezas reseñable. Por ello, se dializarn en tampón Tris 50mM, 25mM NaCl, pH 7.5 para, mediante una cromatografía de intercambio iónico acabar de purificar la proteína.

Para la cromatografía de intercambio iónico se usaron columnas HiTrap SP XL (GE Healthcare), que contienen una resina con carga negativa que permite la interacción con nuestras proteínas, ya que el pH al que estamos trabajando está por debajo del pI de las proteínas y por lo tanto su carga es positiva. De esta manera, al aumentar la fuerza iónica del tampón de elución, el apantallamiento de cargas producido provoca la elución de la proteína. Para ello se usan como tampones de cromatografía:

- Tampón C. Tris 50mM, NaCl 25mM pH 7.5
- Tampón D. Tris 50mM, NaCl 1M pH 7.5

Gracias al equipo AKTA prime (GE Healthcare) se realiza un gradiente lineal de fuerza iónica mediante el incremento del porcentaje de tampón D. Las proteínas empiezan a eluir cuando la concentración de NaCl supera los 100mM, y las fracciones se recogen y analizan mediante PAGE-SDS.

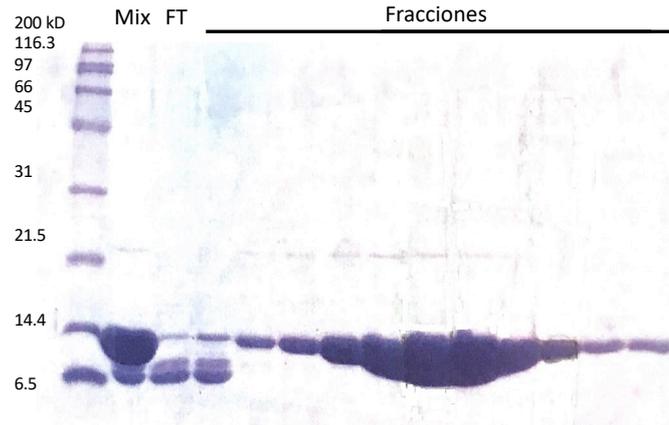


Figura 2.4 PAGE-SDS de la cromatografía de intercambio iónico de la proteína covREC-NTP

Mediante estas dos cromatografías obtenemos las proteínas con un grado de pureza elevada, que nos permite realizar su caracterización biofísica y funcional con alta precisión.

2.2 Caracterización biofísica de las proteínas

2.2.1 Dicroísmo circular (CD)

La espectroscopía de dicroísmo circular es una técnica muy útil para la caracterización de la estructura de una proteína. Dependiendo del rango de longitud de onda (λ) con la que irradiamos la proteína, se puede obtener información de la estructura secundaria o de la estructura espacial (“terciaria”) de la misma.

- **Estructura secundaria:** Para obtener estos datos de una proteína, el espectro de luz utilizado es ultravioleta lejano, conocido como Far-UV, un rango de λ entre 190-260 nm. Las estructuras secundarias más reconocibles por esta técnica son α -hélice, lámina- β , y random-coil (estado desplegado)⁶². Cada una de estas estructuras presenta un espectro diferente y característico que las hace fácilmente distinguibles.

Las α -hélices presentan un espectro de dicroísmo con dos mínimos absolutos a 222 y 208 nm. La lámina- β presenta un único mínimo alrededor de 215 nm y la estructura desplegada tiene un mínimo entre 195-200 nm. Estos datos se pueden comprobar en la figura 2.5.

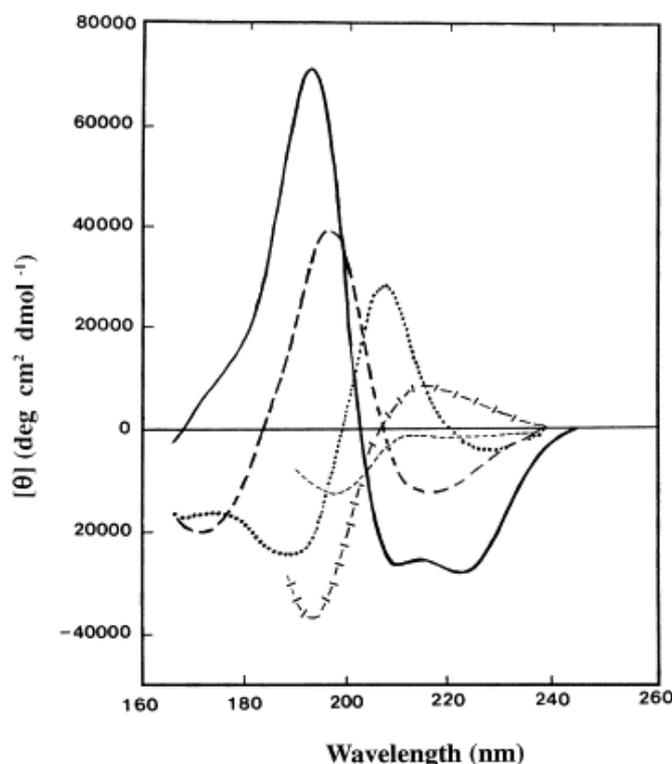


Figura 2.5. Espectros de CD de estructuras secundarias de proteínas. Línea continua - α -Hélice. Discontinua - lámina- β . Puntos - giro β . Discontinua corta - desplegada. Figura adaptada de Kelly SM et al. 2005¹

El mayor problema radica en que, por lo general, las proteínas tienen una combinación de diferentes estructuras secundarias, lo que provoca una suma de los diferentes espectros de cada una. En la actualidad, gracias a programas informáticos, estos espectros se pueden deconvolucionar, obteniendo así una idea aproximada del porcentaje de cada estructura secundaria presente en la proteína. Todas las proteínas presentan en mayor o menor medida la repetición de estas estructuras secundarias, por eso es posible encontrar proteínas completamente diferentes en cuanto a estructura terciaria y función que tengan espectros de Far-UV CD muy similares entre ellas.

En nuestras proteínas, debido al trímico de α -hélices del que derivan, encontramos casi exclusivamente estructura secundaria en α -hélice, por lo que esta técnica nos permite caracterizar fácilmente si existe plegamiento de las proteínas diseñadas.

- **Estructura terciaria.** Que una proteína tenga estructura secundaria no quiere decir que esté perfectamente plegada y sea funcional, ya que la conformación terciaria es la más importante de una proteína. Las medidas de CD en el ultravioleta cercano (Near-UV) nos permiten tener cierta información acerca de

la conformación que tienen los aminoácidos con grupos cromóforos de las proteínas y cómo reacciona la posición de dichos aminoácidos frente a un cambio en su entorno próximo, ya sea un cambio en el tampón de disolución de la proteína, un cambio por interacción con moléculas ligandos, etc. Debido a que la disposición espacial de los cromóforos depende de la estructura terciaria final de la proteína, es muy difícil que coincidan los espectros de Near-UV CD de dos proteínas diferentes, aunque la composición de estructura secundaria sea muy similar. Por lo tanto, los espectros de de Near-UV CD se consideran “huellas dactilares” de las proteínas, ya que cada proteína tiene un espectro característico. Algunas de nuestras proteínas presentan un resto de triptófano embebido en una región hidrofóbica, llamado bolsillo hidrofóbico, (HP). En esta región se pueden producir interacciones con ligandos, que podrían cambiar el entorno del Trp del bolsillo, alterando el espectro de CD e indicando, por lo tanto, que si existe interacción. Por lo tanto, esta técnica nos permite conocer si existe interacción entre nuestras proteínas y péptidos de la región CHR que estén interaccionando en el bolsillo hidrofóbico.

- **Desnaturalización térmica de las proteínas.** En estos experimentos se fija una longitud de onda de interés que corresponde normalmente con una estructura proteica definida, en nuestro caso a 222 nm, uno de los mínimos que presenta la estructura en α -hélice, y se varía la temperatura entre 10 y 98°C. De esta manera la pérdida de elipticidad negativa a 222nm se relacionará con el desplegamiento de la proteína. Gracias al ajuste no lineal de mínimos cuadrados de las curvas de desplegamiento y unión por CD explicado en ANEXOS se pueden calcular la temperatura de desplegamiento (T_m), y la entalpía de desplegamiento (ΔH_{un}) de la proteína.

Los experimentos de Far-UV CD se llevaron a cabo a concentraciones de 15-20 μ M (dependiendo el peso molecular de las proteínas), midiendo en cubetas de paso óptico de 0,1 cm. Se realizaron 5 adquisiciones por espectro para minimizar ruido, a una velocidad de 100 nm/min, en un rango de λ de 200-260 nm.

Los experimentos de Near-UV se llevaron a cabo usando concentraciones de 30-40 μ M con cubetas de paso óptico de 1 cm, ya que la sensibilidad de la señal es menor en el UV

cercano que en el lejano. Debido a la menor sensibilidad se tomaron 20 adquisiciones de cada muestra, a una velocidad de 100 nm/min, en un rango de λ de 250-350 nm.

Los experimentos de desnaturalización térmica se realizaron a concentraciones de 20 μM , en un intervalo de temperatura de 10-98°C, a una velocidad de 2°C/min y un tiempo de respuesta de 1 s.

Todos los espectros de CD se obtuvieron con un espectropolarímetro JASCO modelo J-715 (Tokio, Japón) equipado con un controlador de temperatura Peltier.

2.2.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Esta técnica nos da información acerca del tamaño de las partículas en disolución. Está basada en la dispersión que sufre la luz al incidir sobre las moléculas y el hecho de que esa dispersión no es constante en el tiempo debido al movimiento browniano de las partículas disueltas. Al no ser constante, existirá una fluctuación en la intensidad de la luz dispersada de forma que, analizando la fluctuación con el tiempo se puede deducir el coeficiente de difusión traslacional (D) de las partículas, que está relacionado con su tamaño, más concretamente con el radio hidrodinámico.

El instrumento capaz de medir DLS proporciona una función de autocorrelación de la intensidad de luz dispersada en un periodo de tiempo. Esta función de autocorrelación tiene un único decaimiento exponencial si en la disolución existe una población homogénea de partículas, y una mezcla de múltiples exponenciales si la disolución tiene más de una población. Un análisis matemático de la función de autocorrelación nos proporciona el coeficiente de difusión y con él y la ecuación 2.1, obtenemos el radio hidrodinámico (R_H) aparente de las partículas, figura 2.6.

$$\text{Ecuación 2.1 : } R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D}$$

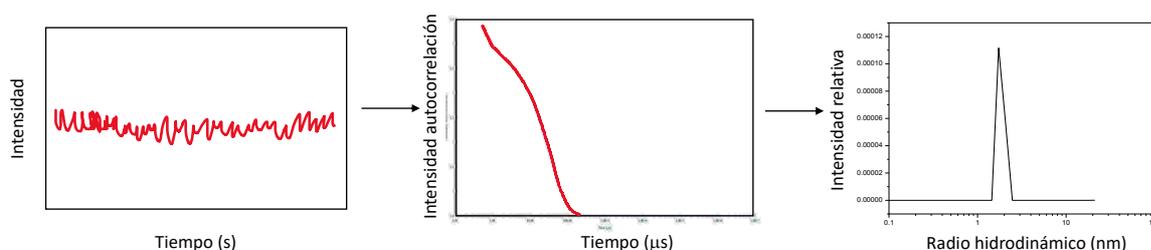


Figura 2.6. Ejemplo de los datos obtenidos por DLS y su tratamiento.

Todas las medidas de radio hidrodinámico se realizaron con un instrumento DynaPro MS-X (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA).

Las muestras fueron centrifugadas durante 30 min a 14000 g y 4°C justo antes de realizar cada medición. Las concentraciones usadas varían según el peso molecular de las proteínas. Generalmente, las moléculas de mayor peso molecular (20 kDa) se midieron a una concentración de 15 μM , mientras que las de menor peso molecular (12kDa) se midieron a una concentración de 25 μM , salvo que se indique otra concentración específica.

2.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que nos permite analizar las propiedades termodinámicas que caracterizan los cambios conformacionales en proteínas, como por ejemplo la desnaturalización de una proteína inducida por calor.

Esta técnica nos permite medir la capacidad calorífica de una proteína en solución, en función de la temperatura, proporcionando información termodinámica del equilibrio de plegamiento-desplegamiento, así como de su mecanismo y cooperatividad. Para el desplegamiento típico de una proteína globular, el termograma obtenido muestra un pico de calor absorbido, inducido por el incremento de temperatura. El calorímetro, trabajando de manera adiabática, mide la diferencia de capacidad calorífica entre dos celdas idénticas, en una hemos añadido la proteína en solución y en la otra el tampón de solución. Una vez finalizado el experimento obtendremos un resultado parecido al mostrado en la figura 2.7.

De un experimento de DSC se pueden obtener directamente parámetros termodinámicos asociados a la transición entre la proteína nativa y desnaturalizada tales como la entalpía, ΔH ; la capacidad calorífica, C_p del estado nativo y desplegado, así como la diferencia entre ambas ΔC_p ; la temperatura de fusión, T_m , como observamos en la figura 2.7. Además, utilizando un análisis basado en un modelo de desplegamiento, es posible obtener la energía libre de Gibbs, ΔG ; y la entropía ΔS , (siempre y cuando el proceso sea reversible y tenga lugar en equilibrio).

Para realizar los experimentos se empleó un microcalorímetro VP-DSC de MicroCal INC. (USA), con células capilares equipado con un sistema de inyección automática de muestras

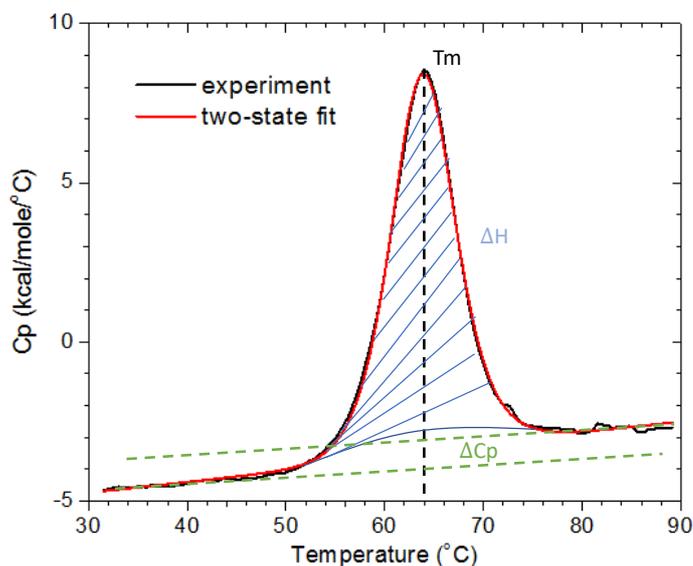


Figura 2.7. Ejemplo del análisis de una transición obtenida por DSC para una proteína y los parámetros que se pueden obtener.

Con nuestras proteínas realizamos dos análisis diferentes, una caracterización de la estabilidad térmica y, además, una caracterización de la unión de un péptido CHR a una de nuestras moléculas cuya afinidad es tan elevada que no se pudo medir con exactitud por calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

- Caracterización de la estabilidad frente a la desnaturalización térmica: Se usaron las proteínas disueltas en dos tampones diferentes, tampón glicina (Gly/HCl) 50 mM pH 2,5 (tampón de almacenamiento de las proteínas) y tampón fosfato sódico (NaPi) 50 mM pH 7,4, empleado como símil de condición fisiológica. Las concentraciones de proteínas usadas fueron 40 μ M y la velocidad de barrido de 120°/h ó 2 K/min entre 5-125°C.
- Caracterización termodinámica de la unión covNHR-VQ + C34: Se realizaron 4 experimentos a 4 ratios diferentes proteína:péptido, entre una relación 1:0 a una relación 1:1.5, fijando la concentración de proteína en 40 μ M y variando la del péptido en cada caso. El tampón en el que se realizaron los experimentos fue NaPi 50 mM pH 7.4. El intervalo de temperatura de los barridos fue de 5-125°C y la velocidad de barrido de 2K/min. Gracias al análisis global de los termogramas de DSC siguiendo el modelo descrito en ANEXOS, se obtuvieron los parámetros termodinámicos de la unión péptido-proteína.

2.2.4 Calorimetría isotérmica de titulación (ITC)

La calorimetría isotérmica de titulación es una técnica especialmente adecuada para proporcionar información sobre los parámetros termodinámicos de la interacción macromolécula-ligando.

El calorímetro tiene una celda, en la que generalmente se deposita la disolución de la macromolécula, y un inyector que permite introducir en la celda pequeños volúmenes (μL) de una disolución del ligando. Si existe interacción y ésta implica un intercambio de calor, se producirá una ligera variación en la temperatura de la celda en comparación con una celda de referencia. El calorímetro registra esa diferencia y trata de volver igualar las temperaturas de las dos celdas proporcionando una potencia calorífica mayor a la más fría mediante un mecanismo de compensación (“feed-back”). Dependiendo de si la reacción entre la macromolécula y el ligando libera o absorbe calor (exotérmica o endotérmica respectivamente), el calorímetro tendrá que suministrar más calor a la celda de referencia o a la de muestra, respectivamente. El termograma registrado, fig. 2.8, consiste en una representación de la potencia suministrada en función del tiempo. De esta manera durante sucesivas inyecciones de ligando veremos como se va liberando o absorbiendo calor en la reacción.

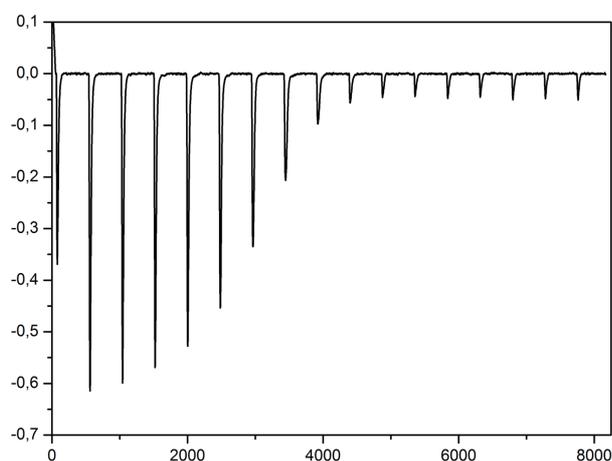


Figura 2.8. Representación del termograma de ITC para una interacción exotérmica entre una molécula y su ligando.

A medida que se añaden a la celda más inyecciones, el número de moles del ligando aumenta superando el número de moles de la proteína. A medida que aumenta la relación ligando/proteína, y suponiendo que la interacción es lo suficientemente fuerte, el calor

que se registra disminuye con cada inyección, llegando a la saturación de la proteína, como vemos en las últimas inyecciones de la fig. 2.8.

Al finalizar el experimento, se realiza una integración de los picos de calor, que nos proporciona un valor del calor liberado. Para ello corregimos las imperfecciones del termograma mediante una línea base, y se normaliza el calor liberado por mol de ligando inyectado. Es importante tener en cuenta los calores finales del experimento. En las inyecciones finales del experimento, la proteína se encuentra saturada por el ligando presente en exceso, por lo que el calor liberado es el calor de dilución del ligando que debemos sustraer al calor liberado de la interacción, si no se llegara a la saturación de la proteína, se debería sustraer el calor de un experimento de dilución independiente, de ligando en tampón. Una vez realizadas estas operaciones obtenemos la isoterma de unión que se muestra en la figura 2.9.

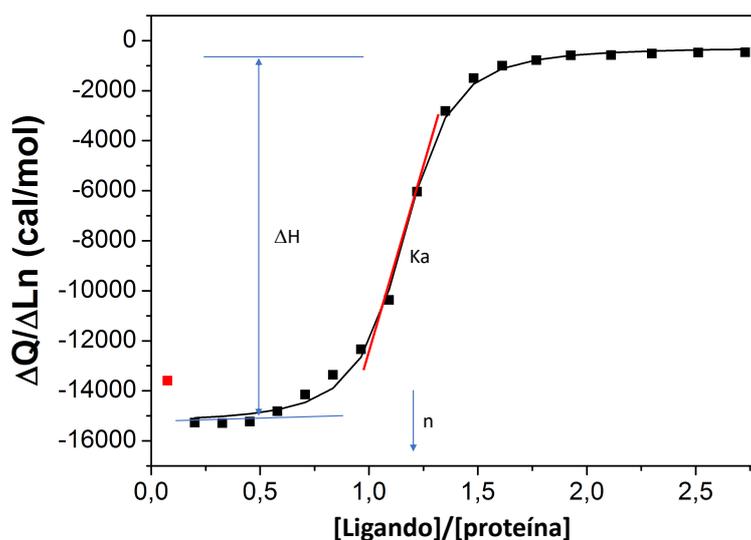


Figura 2.9. Ejemplo de análisis de un experimento de ITC. Los puntos reflejan la isoterma de unión experimental y la línea el ajuste usando un modelo de unión a n sitios independientes.

Con esta isoterma y seleccionando un modelo de unión apropiado que ajuste los datos experimentales se obtienen datos de entalpía, ΔH , la constante de afinidad, K_a ; la estequiometría del proceso, n ; la energía libre de Gibbs, ΔG ; y la entropía ΔS , fig 2.9.

Para el cálculo del parámetro ΔC_p de unión es necesario realizar varios experimentos de titulación del ligando sobre la proteína a diferentes temperaturas. Y representar los valores de ΔH frente a T .

En nuestro caso, realizamos dos metodologías diferentes para abordar la caracterización de la interacción entre nuestras proteínas y los péptidos derivados de la región CHR. Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo con un calorímetro VP-ITC de MicroCal Inc (USA).

2.2.4.1 Ensayos de ITC directos

Son experimentos en los que se titula la proteína, situada en la celda, con el ligando, situado en el inyector. Estos experimentos se realizaron en tampón NaPi 50 mM, pH 7.4. Con una concentración de proteína de 10-20 μM , y una concentración de péptido de 200-500 μM . En nuestro caso, la unión proteína-péptido tiene una estequiometría teórica 1:1, es decir, una molécula de péptido podrá interactuar con una molécula de proteína. Si esto es así, llegar a una relación de 1:2.5 o 1:3 (proteína:péptido) nos proporcionaría información de la interacción hasta llegar prácticamente a la saturación, siempre y cuando la afinidad del péptido sea lo suficientemente alta. Por lo tanto, la concentración de ligando depende de la concentración de proteína cargada en la celda del calorímetro. Y la concentración de proteína depende de un factor llamado $C = K_a \cdot [\text{Proteína (M)}]^{63}$. Si el valor C está entre 4-400, la isoterma de unión resultante tendrá forma sigmoideal, más adecuada para la obtención de los parámetros ΔH y K_a . Un valor de $c < 1$, que se suele asociar a afinidades bajas o concentraciones de macromoléculas usadas bajas, convierte la señal en una recta o parábola de la que es más complicado obtener un valor de ΔH correcto. Si, por el contrario, estamos en un valor de $c > 400$, la pendiente de la sigmoide se vuelve tan pronunciada, que el valor de K_a se vuelve muy inexacto. Esto ocurre si tenemos afinidades muy elevadas o concentraciones de macromoléculas en la celda muy altas, observar fig 2.10⁶⁴.

Para cada sistema, si tenemos valores de K_a bajos, la manera de aumentar el factor c será aumentar la concentración de proteína en la celda en la medida de lo posible. Si, por el contrario, tenemos valores altos de K_a , la manera de ajustar el factor c al adecuado será bajar la concentración de proteína.

Por estos motivos el rango de concentraciones de proteínas y de péptidos usados en los experimentos de ITC directos van de 10-20 μM a 200-500 μM , respectivamente.

Para el análisis de los datos obtenidos en los experimentos directos, se usó un modelo de unión de 1 sitio de unión⁶⁵.

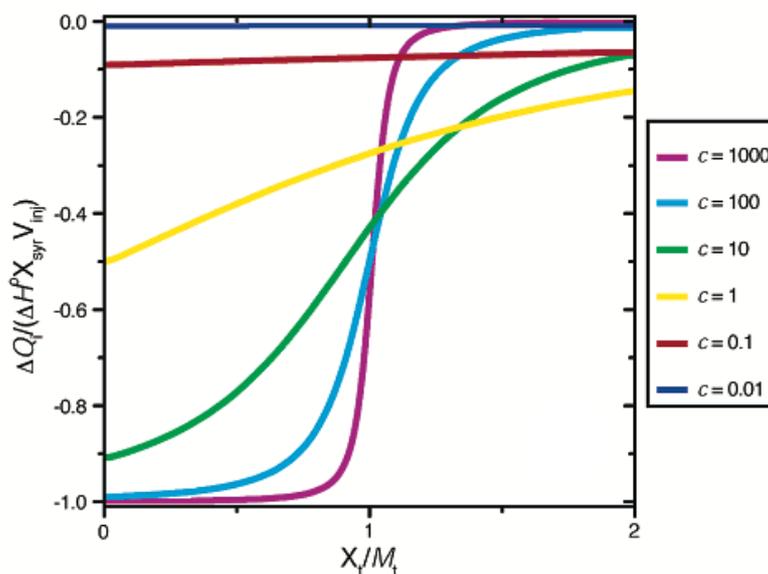


Figura 2.10. Representación de la variación de los resultados obtenidos por ITC variando el parámetro c . Figura adaptada de Turnbull et al, 2003².

2.2.4.2 Ensayos ITC de desplazamiento

Durante la realización de los experimentos de ITC es posible que existan ligandos cuya afinidad no permita el cálculo de los parámetros termodinámicos de manera correcta. Si, por ejemplo, el péptido de estudio tiene una afinidad del orden de o superior a 10^9 , el factor c estará en un rango superior al límite establecido para prácticamente todo el rango de concentraciones de proteínas con el que se puede trabajar. Por lo tanto, un ensayo directo no se puede llevar a cabo, ya que el error en el cálculo de la K_a sería elevado.

De la misma manera, un péptido que tenga una afinidad por la proteína con una $K_a < 10^5$ requeriría aumentar la concentración de proteína en celda y la de péptido en la jeringa a niveles difícilmente accesibles para llegar a saturar dicha concentración de proteína, por lo que el cálculo de sus parámetros termodinámicos se hace inabordable mediante ITC directo.

La manera de solucionar estos problemas es mediante el uso de experimentos ITC de desplazamiento, en los que en la celda del calorímetro introducimos una disolución que contiene una mezcla de proteína y de un ligando a una concentración de ligando saturante, mientras que en el inyector titulamos con otro péptido. El péptido presente en el inyector debe tener una afinidad superior a la del péptido de la celda, de manera que, durante la titulación, pueda desplazar al péptido de baja afinidad. De esta forma, parte de la energía producida por la interacción del péptido más afín, será empleada en el desplazamiento

del otro péptido. Por lo tanto, de esta titulación obtendremos parámetros termodinámicos de unión aparentes, una combinación entre los parámetros termodinámicos de los dos péptidos, fig 2.11⁶⁵. De esta forma, la isoterma de unión presenta una afinidad (K_a) aparente modificada, que permite un análisis más preciso.

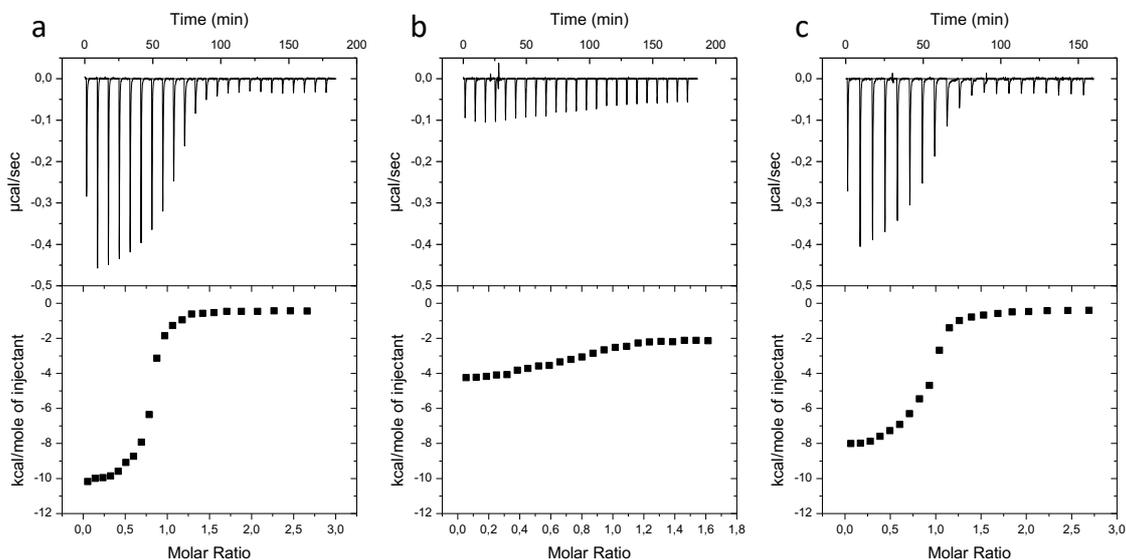


Figura 2.11. Ejemplo experimento ITC de desplazamiento. En la figura a) encontramos la unión del péptido de mayor afinidad, en la figura b), encontramos el péptido de menor afinidad; y en la figura c) el experimento de desplazamiento entre a) y b).

Las concentraciones de proteína y péptido presente en el inyector fueron las mismas que se usaron para los experimentos directos. Es decir, de 10 μM para la proteína y entre 200-300 μM de péptido. La concentración de péptido presente en la celda formando el complejo con la proteína varía dependiendo de la afinidad del mismo, variando entre 10 μM hasta 650 μM .

Los experimentos de competición consisten en varias titulaciones en las que se varía la concentración saturante de péptido presente en la celda, mientras se mantienen constantes las concentraciones de ligando en el inyector y de la proteína en celda. Finalmente, realizamos el ajuste global de las titulaciones, en nuestro caso, 2 titulaciones con concentración variable de ligando en celda y la titulación sin ligando de baja afinidad; siguiendo el modelo de desplazamiento⁶⁶.

Todos los análisis de los datos obtenidos por ITC, tanto en ensayos directos como en experimentos de desplazamiento fueron realizados por el software Origin 8.5 (Originlab).

2.4 Ensayos de actividad

Tanto los experimentos ELISA de unión, como los experimentos de inhibición, se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Christiane Moog unidad U1109 del Instituto de Salud e Investigación Medica Nacional (INSERM), en Estrasburgo, Francia, durante dos estancias doctorales cortas de un mes cada una.

2.4.1 Estudios de unión de las proteínas a ENVs de VIH-1 mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Estos experimentos se realizaron para la obtención de datos funcionales de las proteínas, es decir, una vez que sabíamos de su capacidad de interactuar con péptidos de la región CHR, se probó la posible unión a varias proteínas ENVs recombinantes estabilizadas. Para realizar este estudio se utilizaron ensayos ELISA directos, siguiendo el procedimiento explicado en la fig. 2.12.

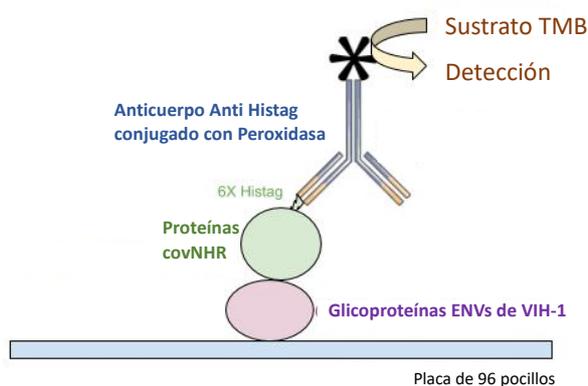


Figura 2.12. Esquema resumen protocolo de ELISA directo de unión.

- En los pocillos de las placas ELISA se adsorben las ENVs a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disueltas en tampón carbonato 0,1 M, pH 8.0 y se incuban O/N a 4°C.
- Al día siguiente se saturan los pocillos con PBS-BSA 2% Tween 0,05% durante 1h a temperatura ambiente.
- Pasado el tiempo de incubación, se añaden las proteínas a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disueltas en PBS-BSA 1%, y se incuban durante 2h a temperatura ambiente.
- Después, se añade el anticuerpo Anti-HisTag (Abcam) en una dilución 1/10000 en PSB-BSA 1%, incubando 1h a temperatura ambiente

- Finalmente se añade el agente reactante TMB (tetrametilbenzidina) que reacciona con la peroxidasa del anticuerpo generando un compuesto colorimétrico.
- A los 6' de añadir el TMB se detiene la reacción con ácido sulfúrico 1 M, midiendo la densidad óptica de las muestras a 450 nm con un lector multi-placas Spectramax i3 (Analís, Bélgica), usando el software SoftMax Pro6.

Los experimentos se realizaron por triplicado, sustrayendo la señal basal del control negativo (pocillo en el que no se fijan ENVs) y refiriendo el porcentaje de unión de cada proteína al 100% de unión obtenido en el control positivo (proteína ENV con extensión de Histidinas).

2.4.2 Ensayos de inhibición del VIH-1 TZM-bl

Para comprobar si las proteínas diseñadas tienen capacidad de inhibir la infección del VIH-1, se realizaron experimentos de inhibición estandarizados, llamados TZM-bl.

Estos experimentos utilizan pseudovirus obtenidos a partir de genomas de diferentes cepas de VIH-1. Estos pseudovirus, aunque infectivos, no son capaces de llevar a cabo el ciclo viral del VIH completo, reduciendo así la peligrosidad de los ensayos de inhibición. Aún así, los pseudovirus presentan las glicoproteínas de membrana (ENV), lo que les permite infectar nuevas células, y algunos genes más, como el de la proteína TAT.

La línea celular utilizada en estos experimentos, 293T, es una línea modificada, cuyo genoma contiene el gen de expresión de la luciferasa, una proteína que emite fluorescencia.

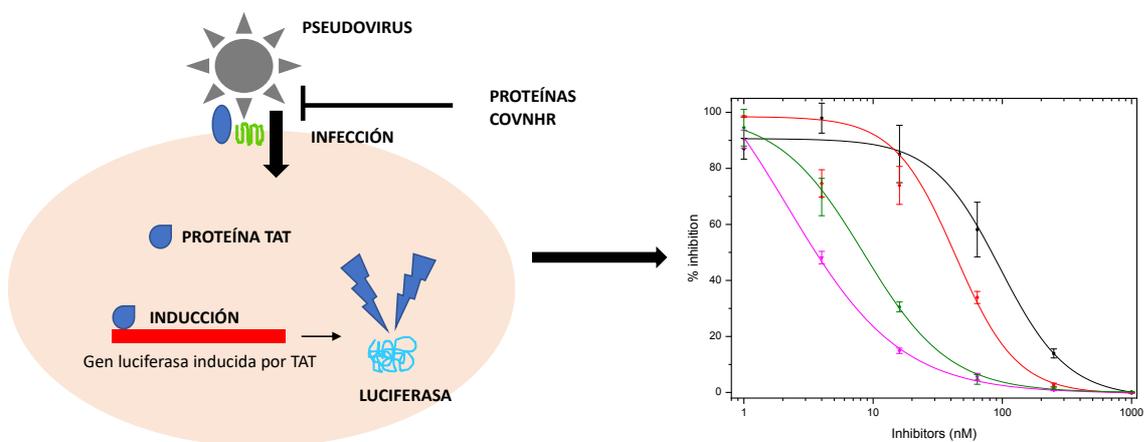


Figura 2.13. Esquema del mecanismo de los ensayos de inhibición TZM-bl. Y los datos obtenidos en dicho experimento.

Además, este gen contiene un factor de inducción dependiente de TAT, por lo que solo cuando el pseudovirus ha infectado la célula y la proteína TAT ha empezado su síntesis se empezará a generar luciferasa. Si al medio añadimos una molécula que impida la infección del virus, en este caso nuestras proteínas, la producción de luciferasa descenderá, pudiendo relacionar ese descenso con el porcentaje de infección, fig 2.13. Para la realización del experimento se siguió el protocolo puesto a punto por el Laboratorio Montefiori⁶⁷.

Debido a la complejidad del experimento de inhibición, además del riesgo del mismo, este tipo de experimento está diseñado para realizarse en un laboratorio de bioseguridad nivel 3. Para poder acceder a este tipo de laboratorios hace falta una acreditación que se consigue al realizar un curso de aprendizaje de varios meses. Dado que no tengo dicha acreditación y debido a que en el corto tiempo de las estancias realizadas en el laboratorio de la Dra. Moog no pude obtenerla, los experimentos de inhibición los realizó un técnico preparado. La preparación de las proteínas y el análisis de los resultados para el cálculo de los valores de IC_{50} , es decir, la concentración de inhibidor a la que se reduce la infección al 50%, sí fueron realizados por mí, ajustando los valores a la función sigmoideal de Hill con el software Origin (Originlab, Northhampton, MA).

Capítulo 3:

Análisis estructural y termodinámico de la inhibición de la fusión del VIH-1 usando proteínas pequeñas miméticas de gp41

3.1 Introducción

Tal y como describimos en la Introducción, nuestro grupo de investigación ha venido trabajando en los últimos años en el diseño de proteínas miméticas del trímero de hélices NHR. Se plantearon diferentes versiones intentando conseguir aquella más estable en condiciones fisiológicas, que no presentase agregación, que tuviera una estabilidad térmica suficientemente elevada y que pudiera tener capacidad inhibitoria frente a pseudovirus de VIH-1⁶¹.

La molécula que mejor cumplía estos requisitos fue la variante covNHR3-ABC. Esta molécula contiene una serie de mutaciones que pretendían una reducción en la hidrofobicidad superficial y la formación de una interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de aminoácidos cargados positiva y negativamente, de tal manera que ayudasen a la estabilización de la estructura, aumentando su temperatura de fusión, reduciendo la tendencia a la agregación que tienen las regiones NHR⁶⁸, y permitiendo una mejor caracterización biofísica y funcional.

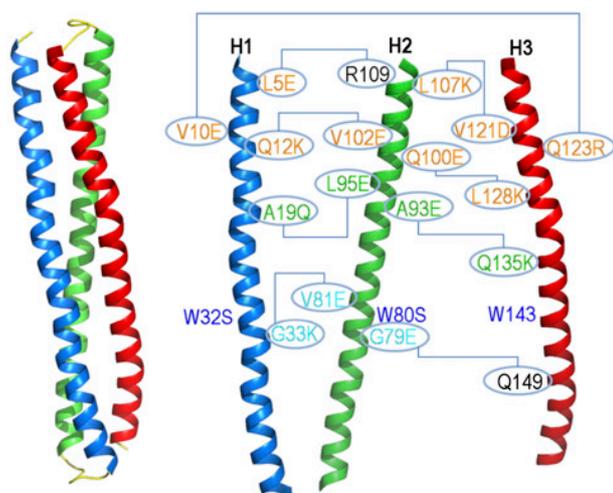


Figura 3.1. Esquema de las mutaciones llevadas a cabo en los aminoácidos de las diferentes hélices de covNHR-ABC, para la formación de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Las hélices H1 (azul) y H3 (roja) son las hélices paralelas, mientras que la hélice H2 (verde) se encuentra en disposición antiparalela. Figura adaptada de¹.

Como observamos en la figura 3.1, la molécula presenta una serie de interacciones electrostáticas entre las hélices H1-H2 y H2-H3, marcadas por líneas azules. Al estar la hélice H2 en disposición antiparalela a las otras dos, las superficies de interacción entre H1-H2 y H2-H3 no tienen una conformación nativa, por lo que los cambios producidos por las mutaciones en esas regiones no afectan a la posible interacción con la región diana CHR. Sin embargo, si nos fijamos en las hélices H1-H3, en cuya superficie se lleva a cabo el contacto con CHR, tenemos una interacción electrostática, la producida por la

mutación V10E y Q123-R. El ácido glutámico (Glu) 10, con carga negativa, interacciona con la asparagina (Asn) 123, con carga positiva. Y esta interacción provoca una oclusión en la zona de contacto, figura 3.2. La región CHR interacciona en prácticamente toda la

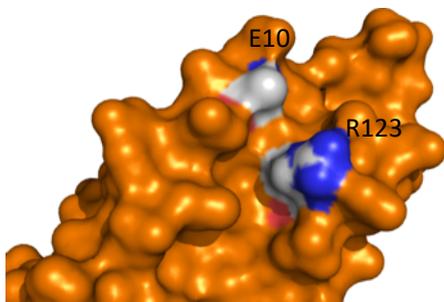


Figura 3.2. Morfología de la región de covNHR3-ABC con las mutaciones V10E, Q123R. PDB: 4R61.

superficie NHR, por lo que un cambio en esa superficie afectaría a la interacción. Además, está descrito en la bibliografía que los pacientes infectados por VIH-1 que han sido tratados con enfuvirtide (T-20) desarrollan nuevas cepas de VIH-1 que son resistentes a T-20 a través de mutaciones en esta misma zona de gp41, tales como G36S, G36V, V38A, Q40H,

etc. Algunas de ellas como la V38E (en numeración de secuencia de gp41) coincide estructuralmente con la mutación V10E en covNHR3-ABC para la formación de la interacción electrostática. También Q40 en la secuencia nativa de gp41, que equivale a Q123 en nuestra proteína sufre mutaciones asociadas a resistencia frente a T20⁶⁹. Debido a gran relevancia de esta zona en la interacción NHR-CHR y en la adquisición de resistencia frente a la inhibición de la fusión por péptidos derivados de CHR, revertimos las dos mutaciones generadas en esa zona de covNHR3-ABC (llamada a partir de ahora covNHR-ER), creando un doble mutante E10V y R123Q (llamado covNHR-VQ) con el objetivo de comparar ambas proteínas. Asimismo, realizamos un análisis termodinámico de cada variante con péptidos derivados de la secuencia de CHR, determinamos la estructura cristalográfica de la variante covNHR-VQ con un péptido derivado de CHR, y comparamos su capacidad inhibitoria sobre diferentes variantes de pseudovirus, incluyendo cepas resistentes a T-20.

3.2 Objetivos

- Comparar cómo afectan las mutaciones a las propiedades biofísicas de las proteínas, estabilidad térmica, tamaño molecular, estructura.
- Estudiar termodinámicamente ambas variantes para entender a qué se debe la resistencia a T-20 por parte de algunas cepas de VIH-1.
- Determinación estructural de las proteínas en complejo con el péptido C34.
- Comprobar si existen diferencias en actividad frente a la infección entre ambas proteínas.
- Entender cómo la región CHR puede ser un objetivo para el diseño de moléculas inhibitoras de la fusión.

3.3 Resultados

3.3.1 Diseño de las proteínas covNHR y caracterización biofísica

Como ya hemos mencionado, la proteína covNHR3-ABC, a partir de ahora llamada covNHR-ER, por los aminoácidos que tiene en las posiciones 10 y 123 respectivamente, presenta alterada la superficie de contacto por lo que revertir las mutaciones a Valina, V10, y Glutamina, Q123, podría suponer cambios en la interacción en la región CHR.

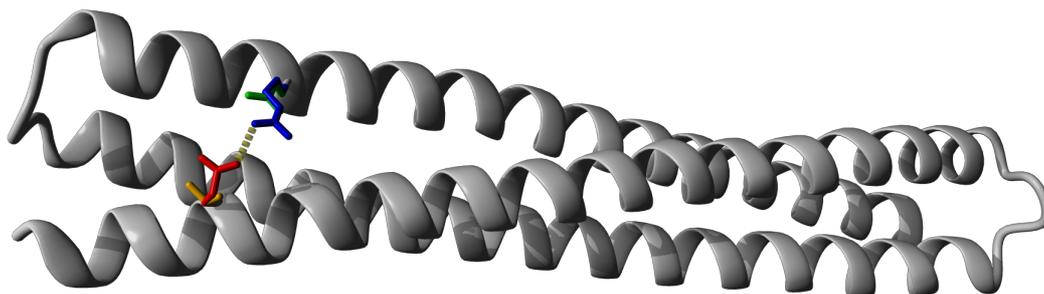


Figura 3.3. Representación esquemática en cintas de las proteínas covNHR-ER y covNHR-VQ (gris). Las cadenas laterales marcadas en rojo y naranja representan el E10 y la V10 respectivamente, y las cadenas laterales en azul y verde indican la R123 y la Q123.

Ambas proteínas se produjeron mediante sobreexpresión en *E. coli* (BLR DE3) y se purificaron con un rendimiento elevado y un alto grado de pureza.

Para la caracterización biofísica se emplearon técnicas previamente descritas como el DLS, que nos permite conocer el tamaño de las proteínas; Far-UV CD, con el que calculamos la estructura secundaria en α -hélice de las proteínas; y la DSC, con la que podemos calcular la estabilidad térmica mediante el valor de T_m y el valor de entalpía de desnaturalización a la T_m (ΔH_m). De esta manera, hemos comprobado cómo influye la pérdida de la interacción electrostática debido a las mutaciones.

Debido a la caracterización previa de covNHR-ER⁶¹, a fin de comparar ambas proteínas, se realizaron los experimentos de caracterización en dos condiciones diferentes. En tampón Glicina 50 mM, pH 2.5, y tampón NaPi 50 mM, pH 7.4.

Si nos fijamos en la figura 3.4, el radio hidrodinámico calculado para ambas proteínas es prácticamente idéntico, entre 2.7-2.8 nm, para las dos condiciones de pH estudiadas, lo que indica un estado monomérico de las proteínas. La figura 3.5 muestra el espectro de CD en el lejano (Far-UV CD), que indica una estructura rica en α -hélice, ambas proteínas muestran entre un 80-85 % de α -hélice, aunque covNHR-ER posee un porcentaje ligeramente superior. Por otro lado, no aparecen grandes diferencias entre las dos condiciones de pH, aunque con algo más de estructura en hélice a pH 2.5.

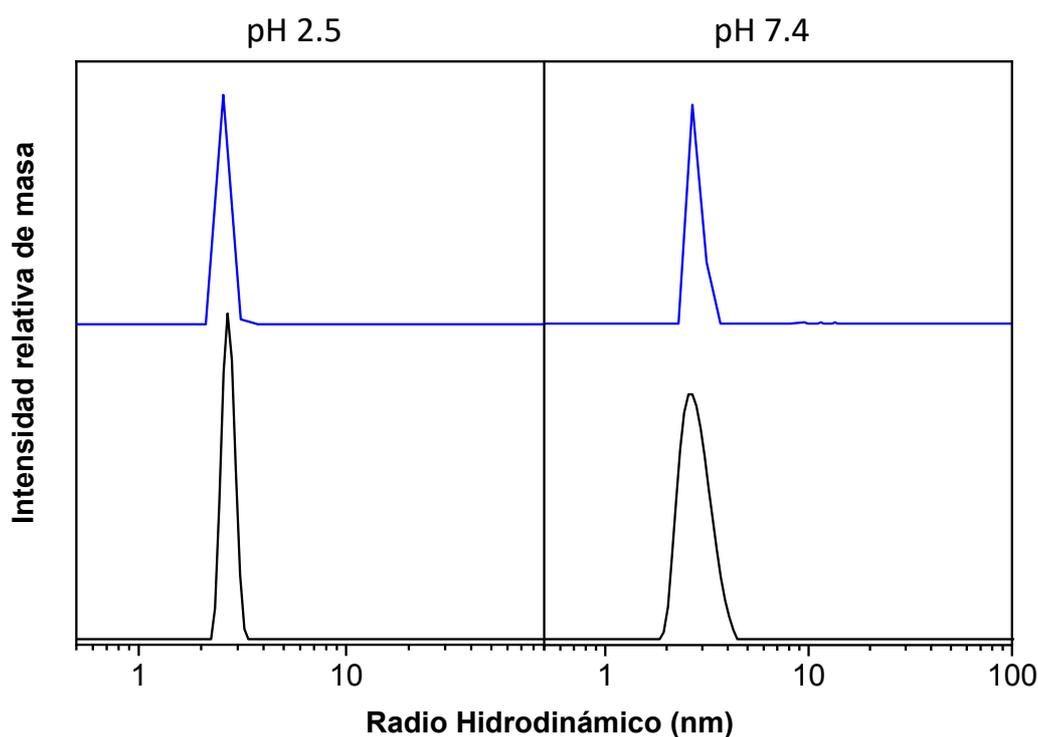


Figura 3.4. Medidas de DLS de las proteínas covNHR-ER (negro), y covNHR-VQ azul en ambas condiciones de pH.

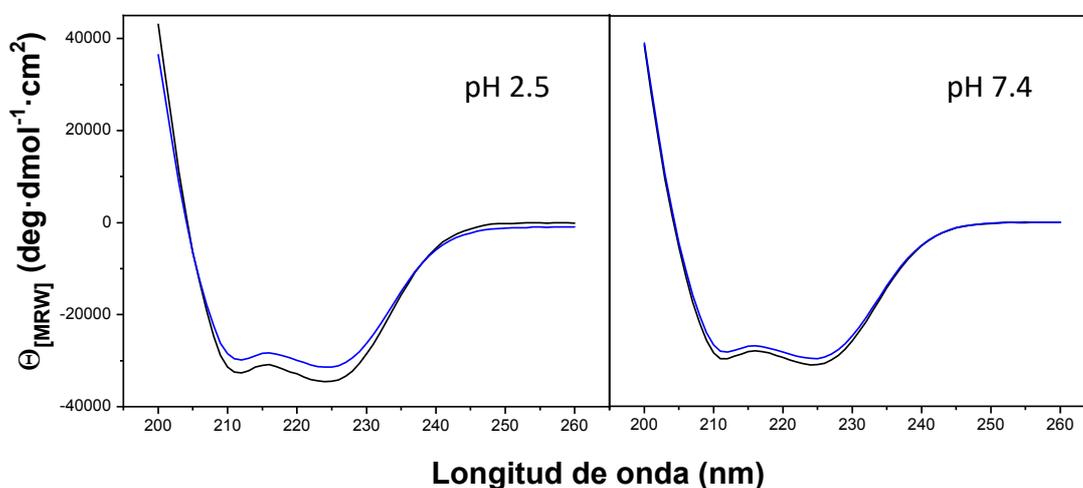


Figura 3.5. Espectros de CD proteína covNHR-ER (negro) y covNHR-VQ (azul).

Por último, en la figura 3.6, observamos la desnaturalización térmica producida por DSC. Aquí sí observamos diferencias entre las 2 condiciones de pH probadas, covNHR-ER tiene una T_m de 88°C y covNHR-VQ de 90°C a pH 2.5. Mientras que a pH 7.4, covNHR-ER tiene una T_m de 107°C y covNHR-VQ de 108°C. Las dos proteínas sufren un proceso de desnaturalización reversible a pH 2.5, mientras que a pH fisiológico, el proceso de

desnaturalización es irreversible, como se observa en la caída pronunciada del pico a partir de los 110°C. Esta irreversibilidad podría deberse a un fenómeno de agregación inducido por alta temperatura. Sin embargo, entre las dos proteínas no encontramos grandes diferencias para la misma condición, aunque sí parece que covNHR-VQ es entre 1-2°C más estable que covNHR-ER, como podemos observar en la figura 3.6.

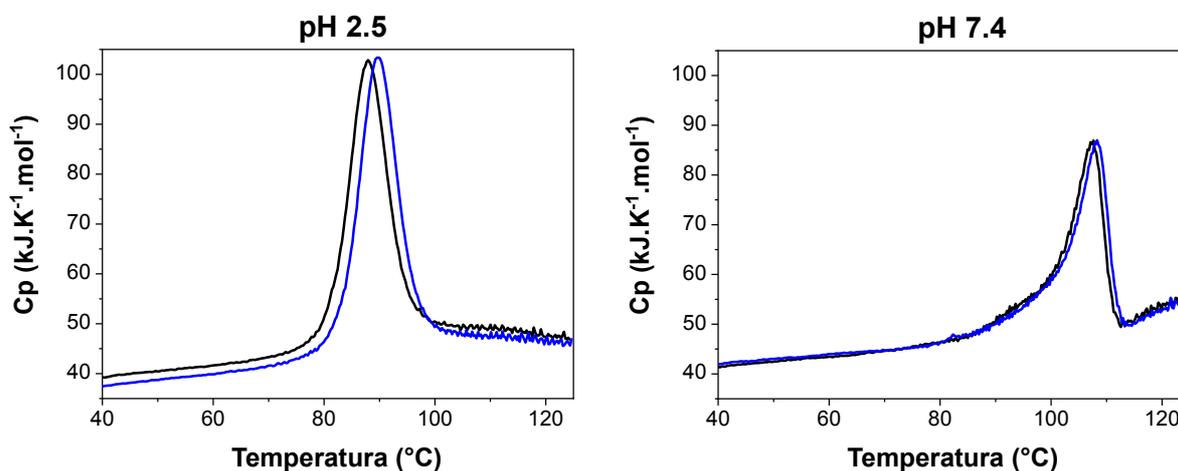


Figura 3.6. Barridos de desnaturalización por DSC que muestran la Temperatura de desnaturalización de las proteínas (T_m), la T° en la que encontramos el máximo del pico. En negro se muestran los barridos de covNHR-ER y en azul los de covNHR-VQ.

Tabla 3.1. Resumen parámetros biofísicos de las proteínas covNHR

Proteínas	pH	% α -hélice*	R_H (nm)	T_m (°C)	ΔH_m
covNHR-ER	2.5	85%	2.8	$87,9 \pm 0,01^+$	$490 \pm 0,6^+$
covNHR-VQ		83%	2.7	$89,7 \pm 0,01^+$	$502 \pm 0,5^+$
covNHR-ER	7.4	84%	2.7	$107,4 \pm 0,02^\#$	$354 \pm 3^\#$
covNHR-VQ		80%	2.8	$108 \pm 0,08^\#$	$296 \pm 2^\#$

*Porcentaje de α -hélice calculado según la elipticidad a 222nm⁷⁰

⁺Datos obtenidos del ajuste a un modelo de desplegamiento de dos estados.

[#]Valores obtenidos del ajuste al modelo de desnaturalización térmica acoplada a unión con un ligando

Por lo tanto, las mutaciones generadas entre las dos variantes, aún eliminando una interacción electrostática, no provocan una pérdida de estabilidad térmica significativa,

ni generan propensión a la agregación, ni impiden que se produzca un correcto plegamiento.

3.3.2 Caracterización de la unión de las proteínas covNHR a péptidos de la región CHR

La diana para la que están diseñadas estas proteínas es la región CHR de gp41. Por este motivo, se investigó la unión de las mismas a péptidos que corresponden a diferentes secuencias de aminoácidos dentro de la región CHR, figura 3.7. Todos los experimentos de unión se llevaron a cabo en tampón fosfato en un pH 7.4.

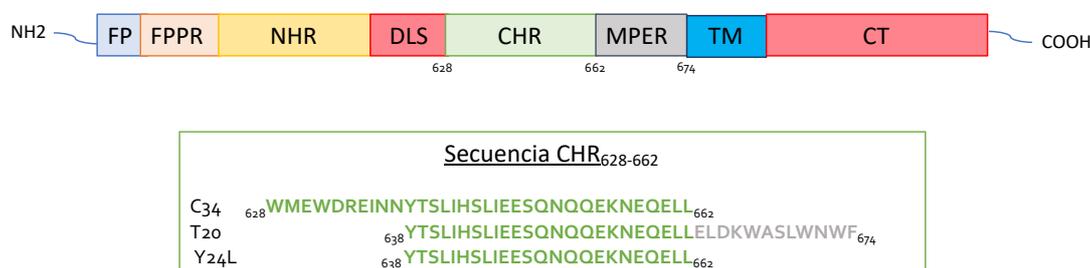


Figura 3.7. Esquema de los diferentes dominios de la proteína gp41 y secuencias de los péptidos utilizados en el estudio de unión, correspondientes a CHR y MPER.

En un primer momento, se comprobó si existía unión de la región CHR mediante FAR-UV CD, utilizando el péptido C34⁷¹ como péptido muy estudiado y representativo de la mayor parte de la región CHR. Los péptidos derivados de la región CHR en disolución presentan una estructura desplegada. Sin embargo, al interactuar con la superficie de NHR adquieren una estructura helicoidal. Por lo tanto, si en los espectros de CD de las proteínas observamos un aumento en la intensidad de la banda de elipticidad negativa podremos inferir que existe unión entre las proteínas y el C34.

Como observamos en la figura 3.8, ambas proteínas tienen una ganancia clara en elipticidad al añadir el péptido en una proporción en exceso, a una ratio proteína:péptido de 1:2. Además, podemos observar cómo la elipticidad a 222 nm de la mezcla covNHR-VQ:C34 es mayor que en la mezcla covNHR-ER:C34. Esto significa que el péptido C34 adquiere un mayor nivel de estructura en α -hélice en su interacción con covNHR-VQ que con covNHR-ER.

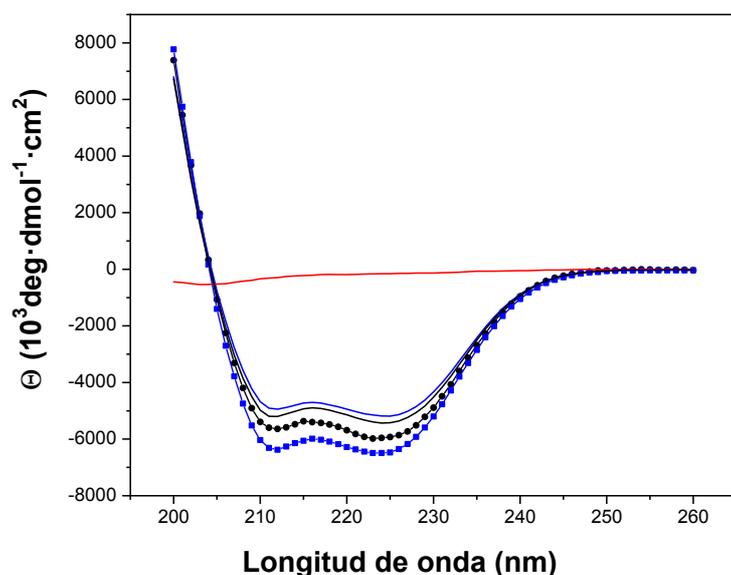


Figura 3.8. Espectros de Far-UV CD, de las proteínas libres y los complejos con C34 (rojo). En azul se representa covNHR-VQ, y la línea azul con cuadrados el complejo covNHR-VQ-C34. En negro se representa la covNHR-ER y con puntos negros el complejo covNHR-ER-C34.

Por otro lado, la presencia de los grupos cromóforos de restos de triptófano implicados en la interacción nos permite realizar estudios de unión por Near-UV CD, ya que las proteínas tienen un bolsillo hidrofóbico (HP), también llamado dominio del bolsillo de unión (PBD de sus siglas en inglés), donde se encuentra el W143.

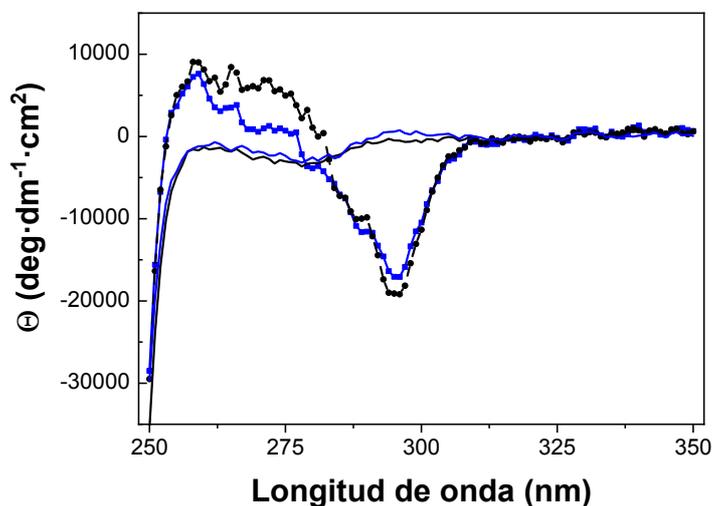


Figura 3.9. Espectros de CD en el cercano de las proteínas libres y los complejos con C34. En azul se representa covNHR-VQ, y la línea azul con cuadrados el complejo covNHR-VQ-C34. En negro se representa la covNHR-ER y con puntos negros el complejo covNHR-ER-C34.

En ese bolsillo se produce la interacción con los 2 Trp del péptido C34, el Trp 628 y el Trp 631; el apilamiento de dichos Trp genera una banda característica de elipticidad negativa a 293 nm⁷². Como podemos observar en la figura 3.9, en presencia de C34 en

una ratio 1:2 se observa un incremento negativo de la elipticidad a 293 nm, sin ninguna diferencia significativa entre las dos variantes. Este resultado indica una interacción similar del péptido C34 en el bolsillo hidrofóbico de ambas proteínas.

Para caracterizar la termodinámica de unión entre C34 y las dos variantes de covNHR, se llevaron a cabo experimentos de ITC. A partir del análisis de la isoterma de unión, se obtuvo que el complejo covNHR-ER:C34 tiene una constante de disociación, K_d , de 14 ± 3 nM a 25°C y una entalpía de unión de -54.2 ± 0.2 . Si nos fijamos en la figura 3.10, la unión de C34 a covNHR-VQ presenta una isoterma de unión con una forma de escalón abrupto, lo que indica una afinidad mucho mayor, tanta que no puede ser determinada con la suficiente precisión por ITC directo.

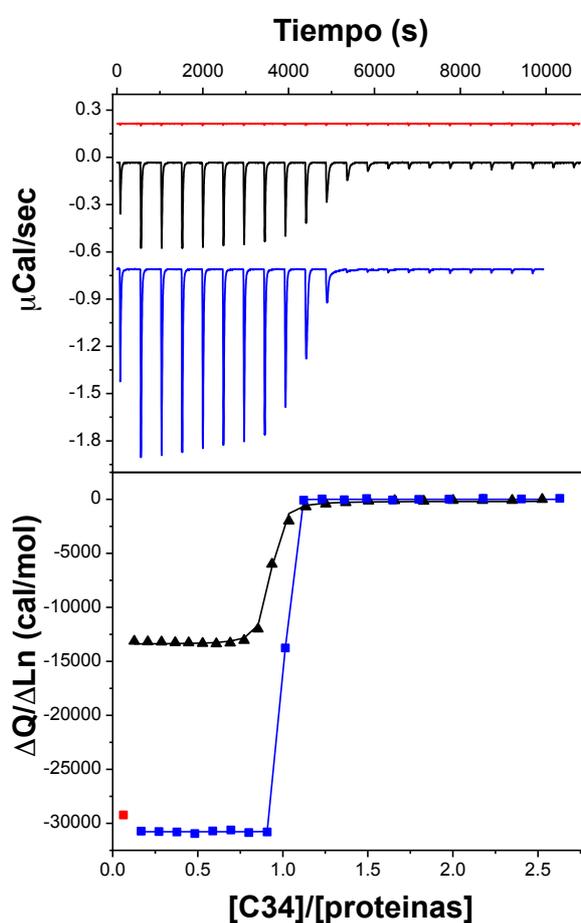


Figura 3.10. Ensayos de ITC directos de las proteínas, covNHR-ER (negro) y covNHR-VQ (azul), tituladas con C34 (titulación de dilución en rojo), a 25°C en tampón 50 mM fosfato a pH 7.4.

Además, la entalpía de unión es más del doble que la de covNHR-ER y C34, lo que indica una interacción mucho más extensa entre proteína y péptido.

También se llevaron a cabo experimentos de ITC directos variando la temperatura, entre 20-35°C, para determinar la capacidad calorífica de unión, teniendo en cuenta la variación de entalpía producida al realizar cambios en la temperatura del ensayo.

Si nos fijamos en la figura 3.11, la capacidad calorífica de la interacción entre covNHR-ER y el C34 es $-2,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, significativamente inferior a la producida por la interacción de C34 y covNHR-VQ, $-3,6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. Estos valores indican una mayor superficie ocluida en el complejo covNHR-VQ:C34 que en el de la variante ER. Este resultado va en consonancia con el resultado de Far-UV CD, figura 3.8.

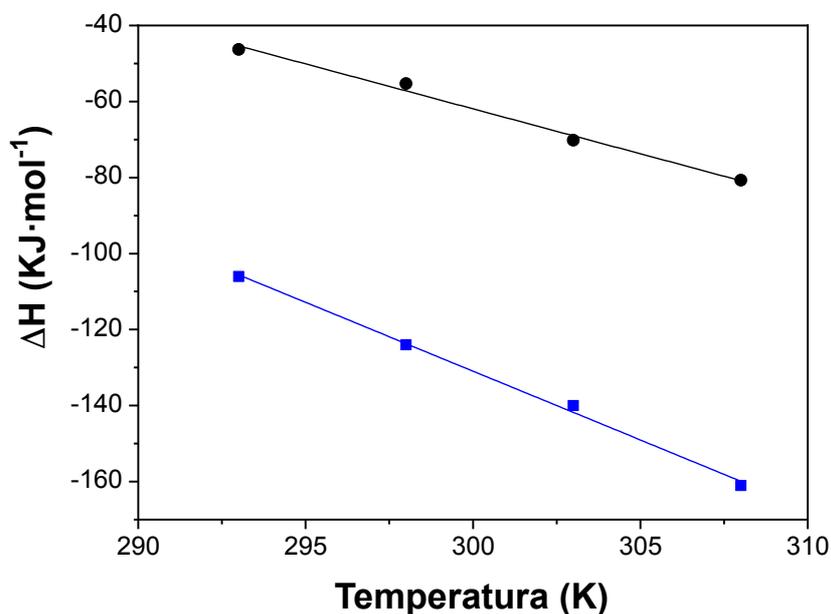


Figura 3.11. Dependencia con la temperatura de la entalpía de unión. Los puntos señalan los valores de entalpía para cada temperatura, negro para covNHR-ER y azul para covNHR-VQ. Las líneas representan la regresión lineal de los datos para la obtención de la capacidad calorífica de unión (ΔC_p).

Para poder determinar de manera precisa la afinidad entre la proteína covNHR-VQ y el péptido C34, se llevaron a cabo experimentos de ITC de desplazamiento, sin embargo, los resultados tampoco desvelaron con claridad la K_d de unión de C34.

Por lo tanto, se plantearon experimentos de DSC con cada proteína en presencia de péptido a diferentes ratios molares, de forma que se observara la influencia de la unión del péptido sobre la transición de desnaturalización. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 7.4, condición en la que ambas proteínas sufren una desnaturalización irreversible en torno a los 110°C.

Si nos fijamos en la figura 3.12, en la que observamos los barridos de DSC correspondientes a diferentes ratios proteína:C34, en presencia del péptido aparece un

hombro a temperaturas más bajas que se superpone a las transiciones de desnaturalización. Ese hombro corresponde al calor de disociación del complejo y es claramente más prominente en el caso del complejo covNHR-VQ:C34. Para analizar los datos de DSC y extraer de ellos las constantes de unión, se utilizó un modelo de Lumry-Eyring de desnaturalización irreversible de proteínas añadiendo un pre-equilibrio de interacción proteína-ligando. El desarrollo matemático ligado a este modelo se encuentra en el apartado de ANEXOS.

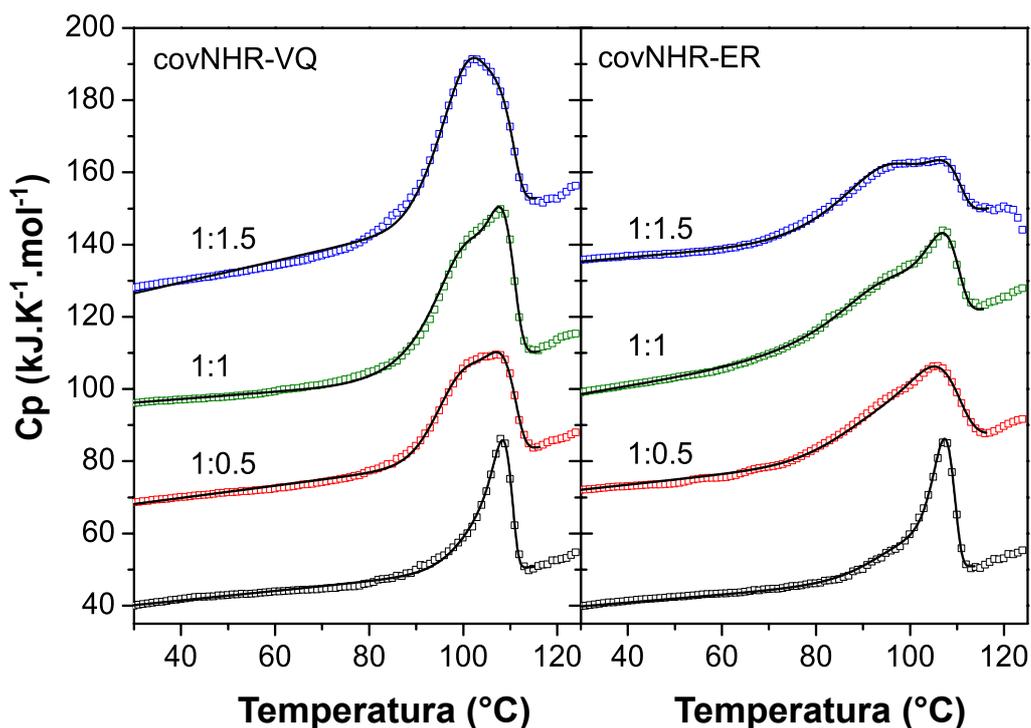


Figura 3.12. Análisis de la disociación de los complejos covNHR:C34 obtenido por DSC. En puntos nos encontramos los datos experimentales y las líneas muestran el ajuste obtenido. El experimento en símbolos negros es el de la proteína libre. Las curvas han sido desplazadas verticalmente en el eje de ordenadas para una mejor visualización.

Los resultados del ajuste global de las curvas de DSC muestran unas K_d a 25°C de 4.5 nM en el caso de la interacción covNHR-ER-C34, y de 0.08 pM, en la interacción covNHR-VQ-C34. En estos ajustes se fijaron los valores de la entalpía y la capacidad calorífica de unión a los obtenidos mediante ITC. Estos resultados muestran una fuerte disminución en la afinidad de la proteína covNHR-ER por C34 en comparación con la extraordinaria afinidad medida para covNHR-VQ. Esto es debido al debilitamiento local de la interacción de la región C-terminal de C34 en el sitio donde se producen las mutaciones de resistencia a T20.

Para corroborar la importancia de esta región de interacción en la unión de T20 con la región NHR, se llevaron a cabo experimentos de ITC entre covNHR-ER y el péptido T20, figura 3.13. Estos experimentos muestran una interacción muy débil. El experimento equivalente con covNHR-VQ y T20 no pudo realizarse debido a la precipitación intensa de la mezcla.

Ya que las proteínas covNHR no tienen los determinantes de unión de la región MPER presente en la secuencia de T20, figura 3.7, se recortó la secuencia de T20 hasta el final de la región CHR, obteniéndose el péptido Y24L. El ensayo de ITC entre el Y24L y la proteína covNHR-ER, figura 3.14, no muestra interacción detectable entre ambas, por lo que la unión débil entre covNHR-ER y T20 mostrada en la figura 3.13 podría deberse a una interacción mediada por los aminoácidos hidrofóbicos presentes en la secuencia MPER de T20. La ausencia de interacción entre Y24L y covNHR-ER demuestra que las distorsiones generadas por las mutaciones en esas regiones es lo que confiere a las cepas de VIH-1 resistencia al fármaco T20.

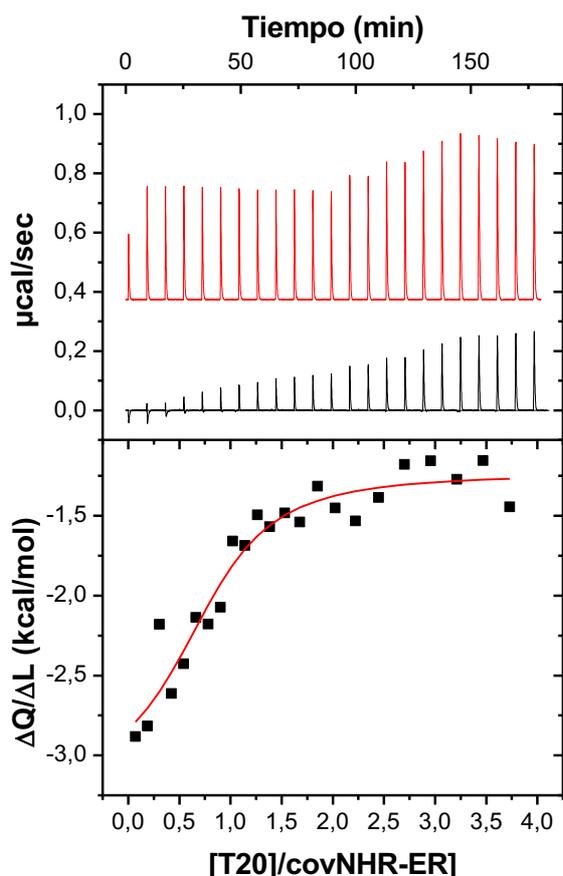


Figura 3.13. Ensayo ITC directo covNHR-ER y T20 a 25°C, en rojo se muestra el ensayo de dilución y la línea roja que atraviesa los puntos muestra el ajuste a un modelo de unión 1:1⁶⁵.

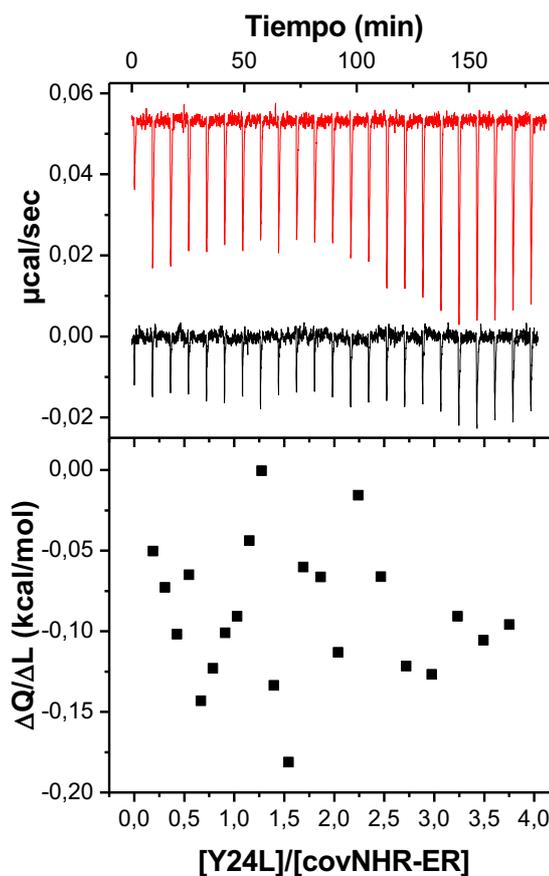


Figura 3.14. Ensayo ITC directo covNHR-ER e Y24L a 25°C, en rojo se muestra el ensayo de dilución.

Sin embargo, como observamos en la figura 3.15, la proteína covNHR-VQ interacciona con una afinidad importante con el péptido Y24L, con una K_d de 81 ± 15 nM y una entalpía de unión fuertemente negativa.

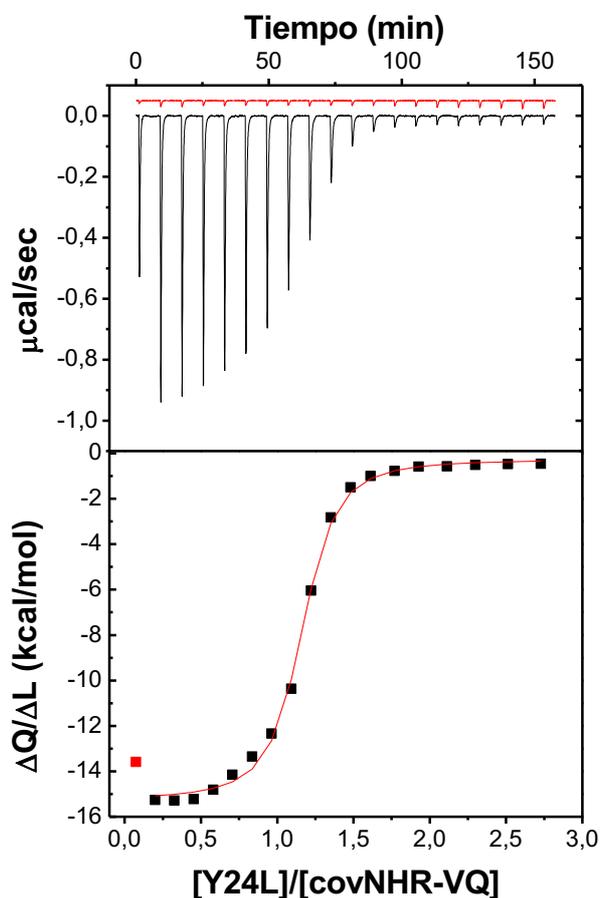


Figura 3.15. Ensayo ITC directo covNHR-VQ e Y24L a 25°C, en rojo se muestra el ensayo de dilución. La línea roja atraviesa los puntos muestra el ajuste a un modelo de unión 1:1⁶⁵.

Todos los parámetros termodinámicos obtenidos por los experimentos de ITC y DSC quedan recogidos en la tabla 3.1. Con la K_d y la entalpía de unión se calcularon los parámetros ΔG y $T\Delta S$, siguiendo las ecuaciones: $\Delta G = RT \cdot \ln(K_d)$ y $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Dichos parámetros se encuentran resumidos en la figura 3.16.

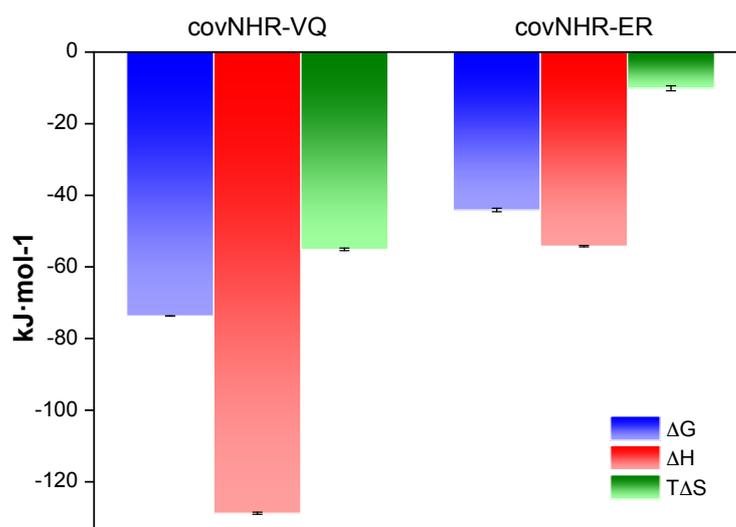


Figura 3.16. Huella termodinámica de la interacción entre C34 y las proteínas covNHR.

Tabla 3.2. Parámetros termodinámicos de la interacción entre péptidos de la región CHR y las proteínas covNHR. Los errores corresponden a un intervalo de confianza del 95% de los ajustes.

Proteína	Péptido	Temperatura (°C)	K _D (nM)	ΔH _b	n	ΔC _{pb} (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
covNHR-VQ	C34	20	-	-108.6 ± 0.4	0.81	-3.6 ± 0.4
		25	0.000076 ± 0.000002 ¹	-128.8 ± 0.3	1.01	
		30		-140.5 ± 0.9	0.93	
		35		-161.2 ± 2.2	0.88	
	Y24L	25	90 ± 7	-68 ± 1	0.90	-
	T20	25	Agregación del complejo			
covNHR-ER	C34	20	19 ± 8	-46.3 ± 0.4	0.94	-2.5 ± 0.4
		25	14 ± 3	-54.2 ± 0.2	0.95	
		30	35 ± 7	-70.2 ± 0.4	0.89	
		35	18 ± 13	-81 ± 1	0.94	
	T20	25	14500 ± 13400	-12 ± 6	1 ²	-
	Y24L	25	Unión no detectable			

¹ Parámetro obtenido por extrapolación a 25°C del análisis de los experimentos de DSC

² Parámetro fijado a 1 para el ajuste

Como podemos observar en la figura 3.16, la entalpía que se genera en la interacción covNHR-VQ-C34 es aproximadamente 3 veces superior a la generada por la interacción de C34 con covNHR-ER. Sin embargo, la energía libre, ΔG, no llega a ser el doble entre ambas interacciones. Esto es debido a una fuerte compensación entrópica, TΔS. En el caso de la interacción covNHR-VQ:C34, la entropía de unión es mucho más negativa, es

decir, es desfavorable a que se desarrolle el proceso, debido principalmente al mayor grado de plegamiento que sufre el péptido C34 al interactuar. En el caso de la componente entrópica de covNHR-ER, su valor es menos negativo ya que parte del péptido se mantiene desplegado.

En definitiva, la ausencia de interacción de Y24L con covNHR-ER, explica porqué las mutaciones en los aminoácidos V38E y Q40R en gp41, (V10 y Q123 en nuestra proteína), evitan la acción del péptido T20, mientras que se mantiene la interacción con la región CHR con alta afinidad, ya que como hemos demostrado, el péptido C34 es capaz de interactuar con covNHR-ER con una K_D de 14 nM, manteniendo así la capacidad de formación de la estructura 6HB y la posibilidad de fusión del virus y la célula.

3.3.3 Estudio del complejo covNHR-VQ y C34 por cristalografía de rayos X

En colaboración con la Dra. Ana Cámara Artigas de la Universidad de Almería, se consiguió obtener cristales del complejo covNHR-VQ:C34, que permitieron obtener imágenes de difracción con una resolución máxima de 1.9 Å. Por desgracia, no fue posible obtener cristales de suficiente calidad para el complejo covNHR-ER con C34, probablemente debido a que la zona del péptido que no es capaz de interactuar en el sitio de resistencia a T20 mantiene una estructura desordenada. Esta parte desordenada podría influir en gran medida sobre la incapacidad de formar cristales.

Como vemos en la figura 3.17, la proteína covNHR-VQ mantiene una estructura helicoidal trimérica muy similar a la que ya se describió para la proteína covNHR-ER libre⁶¹. PDB:4R61. Sin embargo, la mayor resolución, 1,9 Å, de covNHR-VQ:C34 en comparación con 3,6 Å de covNHR-ER, el ligero acercamiento de las hélices NHR entre sí, así como la definición de estructuras nuevas como el segundo loop de covNHR-VQ, sugieren una menor flexibilidad en la proteína provocada por los contactos producidos por el péptido.

Al alinear esta estructura con otras estructuras de construcciones basadas en gp41 en conformación en manojo de 6 hélices, (6HB), presentes en el Protein Data Bank (PDB:1ENV⁷³ o 1IF3⁴⁷), observamos una gran homología. Como se puede observar en la figura 3.18.

Las estructuras muestran una analogía prácticamente idéntica no sólo en la interacción donde se encuentra el bolsillo hidrofóbico, es decir, donde interactúan el Trp 628, Trp

631 y la Ile 635 de CHR, sino en toda la interfase de unión entre NHR y CHR.

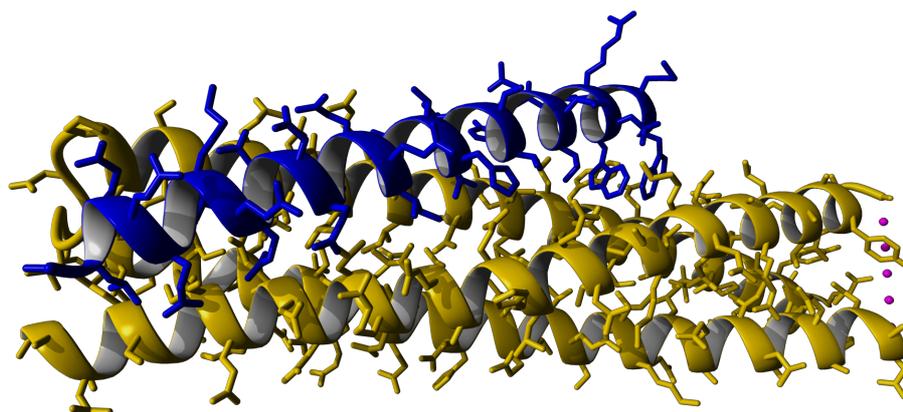


Figura 3.17. Estructura del complejo covNHR-VQ:C34 resuelta mediante cristalografía de rayos X. En amarillo se muestra el esqueleto y las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína y en azul los del péptido. PDB:62RG.

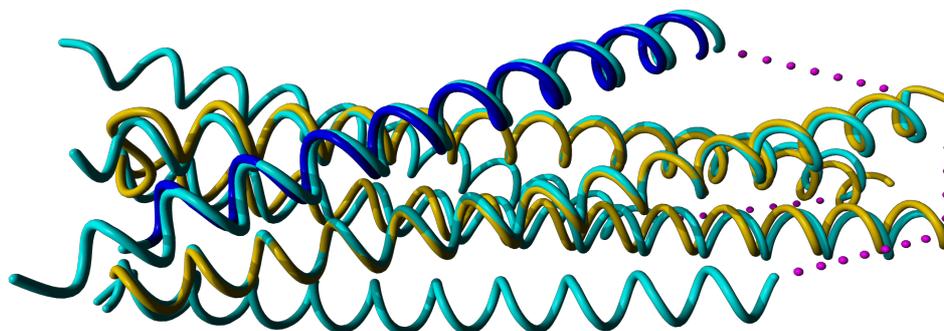


Figura 3.18. Alineamiento del complejo covNHR-VQ:C34, amarillo y azul, con la estructura de una construcción mimética de 6HB de gp41 (PDB: 1ENV), color cyan. Los puntos muestran estructuras sin definir no resueltas.

Un punto importante de la estructura es la presencia de moléculas de agua resueltas y parcial o totalmente ocluidas en la interfase NHR-CHR del complejo. Una de esas moléculas de agua interfacial se encuentra parcialmente enterrada en el hueco que deja la ausencia de cadena lateral de la Gly 119, Gly 36 en la secuencia de gp41, que tiene una alta tendencia a la mutación en cepas del VIH-1 resistentes a T20, como ya hemos visto. Curiosamente, otra molécula de agua se encuentra enterrada en la región mutada en covNHR-VQ, V10 y Q123. Esta molécula de agua establece puentes de hidrógeno con las cadenas laterales polares de varios aminoácidos que la rodean, Gln13 de la proteína y Gln26 y Asn29 del péptido, figura 3.19.

Las mutaciones en V10E y Q123R rellenan el espacio donde se encuentra la molécula de agua, desplazándola. De esta manera, se distorsiona la red de conexiones entre la molécula de agua y las cadenas laterales de los aminoácidos de NHR (Q13, Q123) y CHR

(Q26 y N29), de la figura 3.19, lo que explica la gran diferencia de afinidad en la interacción de covNHR-ER por C34 con respecto a covNHR-VQ.

Además, estas moléculas de agua interfacial parecen ser importantes y necesarias en la correcta interacción NHR-CHR, ya que están presentes en puntos donde se genera resistencia al fármaco T20.

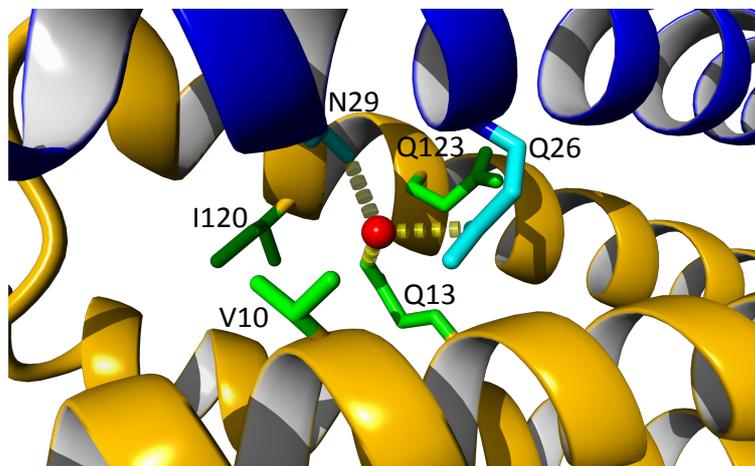


Figura 3.19. Molécula de agua enterrada en el complejo covNHR-VQ:C34. Los puntos amarillos indican los puentes de hidrógeno formados entre la molécula y los aminoácidos del complejo. En verde se muestran las cadenas laterales de la proteína y en azul las cadenas laterales de los aminoácidos del péptido.

3.3.4 Inhibición de la infección de VIH-1

Por último, probamos la capacidad de las proteínas para inhibir la infección por VIH-1 y entender cómo afecta a la capacidad de inhibición la perturbación provocada por las mutaciones en V10 y Q123.

El potencial inhibidor de las proteínas covNHR se comprobó mediante ensayos estándar de inhibición TZM-bl. El potencial inhibidor se comparó con los del fármaco T20 y del péptido C34. Estos experimentos de inhibición se realizaron con pseudovirus de VIH-1 correspondientes a diferentes clases⁷⁴, además de un virus aislado primario, el CN54.

Si nos fijamos en la tabla 3.2, ambas proteínas demostraron tener una alta capacidad inhibidora para todos los pseudovirus ensayados. La proteína covNHR-VQ presenta una IC_{50} , ligeramente inferior y más homogénea que la proteína covNHR-ER para todos los pseudovirus probados, Estos datos indican que la distorsión producida por la mutación ER resta capacidad inhibitoria, aunque no de una manera tan pronunciada como sucede con la afinidad por los péptidos CHR. Si observamos los resultados obtenidos con la capacidad inhibidora del fármaco T20, vemos que el T20 es muy efectivo para algunas

variantes, pero su actividad se ve fuertemente reducida para otras, como TRO11, 398F1 y SF162.

Si comparamos la inhibición producida por el péptido C34, sus valores de IC₅₀ son comparables a los valores de la proteína covNHR-VQ para todos los pseudovirus, excepto para el CN54.

Si nos centramos más detenidamente en las cepas resistentes a T20, PNL4.3 tiene en su secuencia un Asp en la posición 36, en vez de Gly. Esta mutación ya genera cierta pérdida de potencial inhibitorio, si nos fijamos en la tabla 3.2 y en la figura 3.21. La cepa PNL4.3(DIM) resistente a T20 tiene además otra mutación, la Val 38 (Val 10 en nuestra proteína) muta a Met. Esto genera un aumento en la IC₅₀ del T20 de hasta 100 veces más comparándolo con otras cepas. Algo similar sucede con el péptido C34, al tener parte de su afinidad disminuida debido a las mutaciones presentes en la cepa resistente a T20, como le ocurre con nuestra proteína covNHR-ER, su capacidad de inhibición se ve afectada, aumentando su IC₅₀. Sin embargo, las proteínas covNHR no ven afectado su potencial de inhibición ya que su región diana es la secuencia CHR, donde no hay mutaciones en esta cepa.

Tabla 3.3: Inhibición *in vitro* del VIH-1 por proteínas covNHR y péptidos de CHR. La actividad inhibitoria (IC₅₀) se midió con el ensayo estándar TZM-bl utilizando pseudovirus con Env de varias clases, un virus primario y un pseudovirus resistente al T20. (Los datos se obtuvieron de triplicados)

Pseudovirus	Clase	covNHR-ER	covNHR-VQ	T20	C34
<i>BG505</i>	A	34 ± 1	13 ± 1	4 ± 0.4	4 ± 2
<i>TRO11</i>	B	46 ± 3	16 ± 4	38 ± 4	16 ± 4
<i>25710</i>	C	25 ± 1	12 ± 1	4 ± 3	3 ± 0.4
<i>398F1</i>	A	65 ± 3	11 ± 3	147 ± 10	14 ± 1
<i>CE1176</i>	C	30 ± 3	13 ± 0.3	4 ± 2	10 ± 1
<i>CN54</i> ¹	B'/C	96 ± 22	43 ± 10	2 ± 1	8 ± 2
<i>SF162</i>	B	33 ± 5	8 ± 2	51 ± 1	10 ± 1
<i>MW965.26</i>	C	9 ± 2	2 ± 1	4 ± 1	1 ± 0.1
<i>pNL4-3</i>	B	5.1 ± 0.3	2.0 ± 0.4	38 ± 3	3.1 ± 0.3
<i>pNL4-3(DIM)</i> ²	B	6 ± 1	3.1 ± 0.3	494 ± 256	15 ± 1

¹ Virus primario

² Cepa resistente a T20

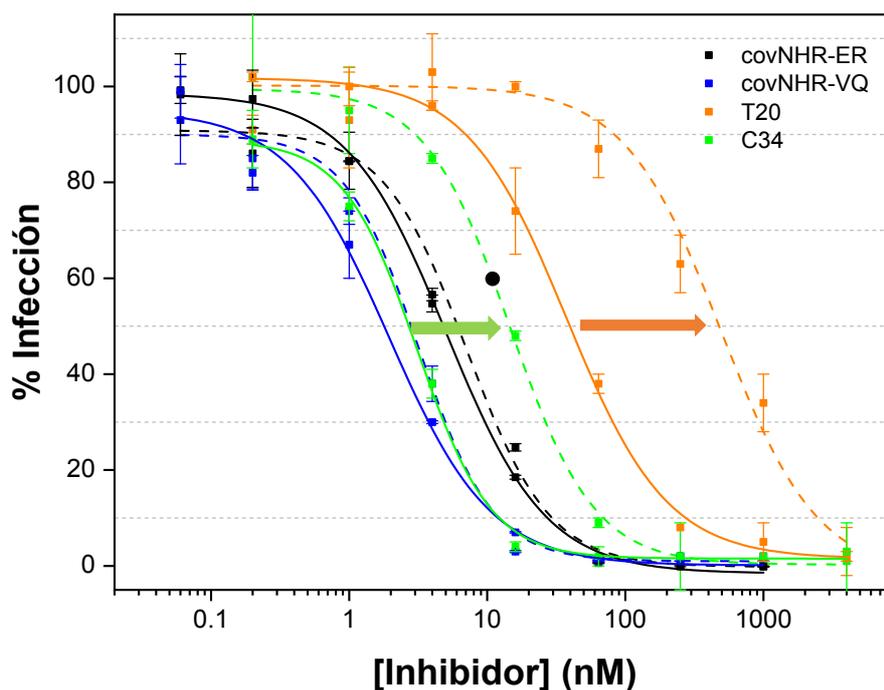


Figura 3.21. Ensayo TZM-bl de inhibición de la cepa PNL4.3 y PNL4.3(DIM) resistente a T20. Las líneas continuas muestran el ajuste de los datos obtenidos para la cepa PNL4.3 y las discontinuas el ajuste para los valores obtenidos de la cepa resistente a T20. Las flechas muestran la diferencia entre los valores de IC₅₀ de C34 y T20 para ambas cepas.

3.3.5 Unión de las proteínas covNHR a ENVs nativas

Una vez caracterizada la interacción de las proteínas con péptidos de la región CHR. Se comprobó si las proteínas eran capaces de unirse a estructuras de la ENV nativas solubles y estabilizadas de gp41. Estas estructuras presentan las proteínas gp120 y gp41 interaccionando entre sí mediante puentes disulfuro, o eliminando el sitio proteolítico de furina presente en su precursor gp160, evitando así el procesamiento que sufren en el interior celular. Además, tienen eliminada la región próxima a la membrana del virus y la región transmembrana y citosólica de gp41. Se pueden presentar de forma monomérica o trimérica. En la actualidad existen un gran número de estructuras diseñadas⁷⁵.

Las proteínas covNHR, al tener las regiones de interacción con CHR, podrían reconocer esas secuencias en las estructuras ENV nativas e interaccionar con ellas, siempre que estén accesibles, actuando de inhibidor de la formación de la estructura 6HB antes de iniciarse las etapas de fusión.

Para comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos ELISA de unión, en los que se probaron varias ENVs estabilizadas y solubles diferentes. Las diferencias radican en los

mecanismos de estabilización, así como, del virus del que se obtuvo. Las ENV JR-FL Wyatt, gp140 YU2 y gp140 CN54 son estructuras triméricas de gp120 y gp41. Mientras que las ENV gp160 HIV LAI y gp160 THO23 son monómeros de gp120 y gp41 asociados.

Como podemos observar en la figura 3.20, ambas proteínas pueden interaccionar con las estructuras ENV nativas, aunque parece que la proteína covNHR-VQ es capaz de conseguir un porcentaje de unión más elevado y homogéneo para todas las ENV probadas. Estos datos concuerdan con su mayor afinidad por el péptido C34.

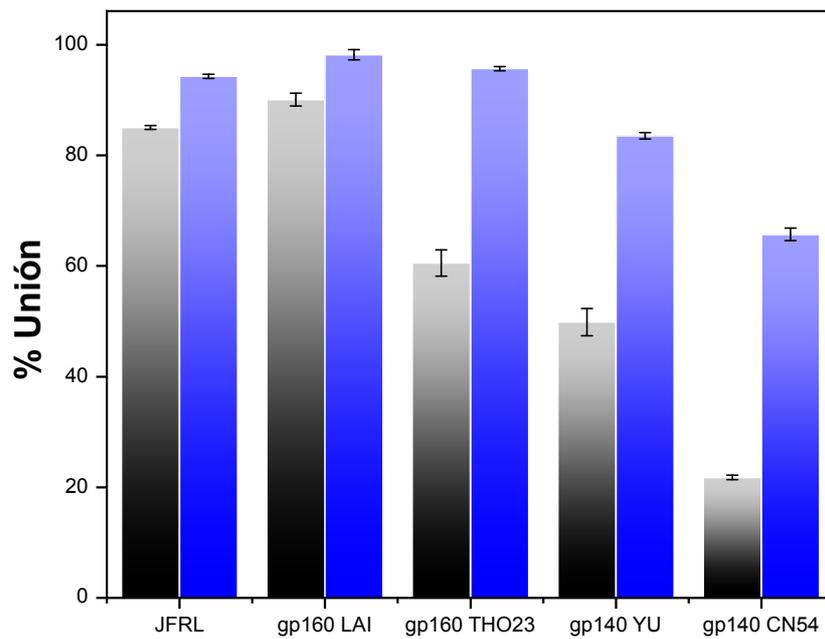


Figura 3.20. Experimento ELISA de unión entre la proteína covNHR-ER (negro) y la proteína covNHR-VQ (azul), con diferentes ENV. Las ENVs son fijadas a la placa ELISA y las proteínas se añadieron en una concentración de 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La unión se detecta usando un anticuerpo anti-Histag conjugado con peroxidasa. Los datos muestran el porcentaje de unión obtenidos de triplicados. El porcentaje de unión se determinó por la normalización a 100% de unión de una ENV que contiene Histag.

3.4 Discusión

3.4.1 Características estructurales y termodinámicas de la interacción NHR-CHR

Este estudio remarca el potencial de las proteínas covNHR como sistema mimético extremadamente preciso de la superficie que se expone en el trímero NHR de gp41. Por ello, estas proteínas constituyen un modelo realmente útil para el estudio de las interacciones que se producen en gp41, necesarias para que se lleve a cabo la fusión de la membrana de VIH-1 a la membrana de la célula. De hecho, la estructura cristalizada del complejo covNHR-VQ y C34 muestra unas interacciones NHR-CHR idénticas a la que se observa en varias estructuras post-fusión de gp41 previamente reportadas⁷³. Incluyendo las moléculas de agua enterradas en el complejo.

Añadidos a la información estructural, los datos termodinámicos aportados clarifican las fuerzas que dirigen las primeras etapas de fusión, así como la inhibición y la aparición de resistencias.

En este estudio, hemos encontrado una afinidad entre covNHR-VQ y el péptido C34 extremadamente elevada ($K_d = 0,08 \text{ pM}$), una de las afinidades más altas hasta la fecha descritas en interacciones NHR-CHR, si bien comparable a la obtenida por Root y colaboradores con su molécula 5-helix, ($0,6 \text{ pM}$) utilizando el péptido C37 (residuos 625-661 en la secuencia de gp160)⁷⁶. Sin embargo, no existen trabajos que detallen de manera calorimétrica la termodinámica de las interacciones producidas entre las regiones NHR-CHR, probablemente debido a la dificultad que radica encontrar un sistema óptimo de estudio, ya que las construcciones derivadas de gp41 no tienen a menudo un buen comportamiento. Por ejemplo, He y colaboradores⁷⁷ realizaron experimentos de ITC entre péptidos de las regiones NHR y CHR, utilizando diversos mutantes del péptido N36 y el péptido C34. Las afinidades encontradas están en el rango micro-nanomolar; aunque debido a problemas de agregación de los péptidos N36 no se obtienen estequiometrías normales. Esas mismas afinidades se encontraron con otros péptidos como N46 y C34⁷⁸. Si pasamos a constructos derivados de gp41, Deng y colaboradores midieron la unión de 5-helix a péptidos CHR⁷⁹, pero obtienen afinidades relativamente bajas ($K_d = 0,8 \text{ }\mu\text{M}$) si las comparamos con las medidas por Root⁷⁶ o con las obtenidas con nuestros diseños. Existen estudios termodinámicos más detallados usando el constructo IQN17, otro mimético trimérico de NHR. Pero los estudios se enfocaron a la unión de péptidos cortos de CHR, péptidos cíclicos y péptidos cortos helicoidales, dirigidos al bolsillo

hidrofóbico^{80,81}. En estos estudios las afinidades obtenidas están en el rango micromolar, lo que sugiere que para que se den interacciones fuertemente afines es necesaria una interacción mucho más extensa entre CHR y NHR.

3.4.2 Mecanismo molecular de resistencia a péptidos miméticos a CHR

El tratamiento prolongado con T20, conocido clínicamente como enfuvirtide, provoca la aparición de cepas de VIH-1 resistentes, que presentan una o varias mutaciones en la región que abarca los aminoácidos 36 a 45 en la secuencia de gp41^{82,83}.

Las mutaciones producidas en la Val 38 son particularmente frecuentes, especialmente los cambios a aminoácidos más pequeños como Ala, Gly y Ser, o a aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas, como Met y Trp, lo que provoca una perturbación en las interacciones de Van der Waals que se producen en esa zona⁸⁴. La mutación V38E, estudiada en este trabajo, confiere una resistencia particularmente alta a T20 y a C34^{83,85}, así como a otro inhibidor de segunda generación llamado T-1249⁸⁴. También aparecen mutaciones en Gln 40 como respuesta al tratamiento de T20⁸⁶.

La caracterización estructural y termodinámica de nuestras proteínas aporta una clara interpretación, desde el punto de vista molecular, de la adquisición de estas resistencias al tratamiento con péptidos miméticos de CHR dirigidos a la región NHR. Como hemos visto, el resultado de las mutaciones ER provoca un descenso de 5 órdenes de magnitud en la afinidad de covNHR-ER por C34, al compararla con la interacción covNHR-VQ:C34. La energía de Gibbs (ΔG) se ve incrementada en valor absoluto unos 30 kJ·mol⁻¹, como resultado de un gran incremento en la entalpía de unión.

Si nos fijamos en la capacidad calorífica de la interacción, el complejo covNHR-VQ:C34 presenta un valor más negativo, aproximadamente un 50% mayor al obtenido por covNHR-ER, como resultado de una mayor superficie de interacción con el péptido, aproximadamente un tercio más de superficie de contacto. Todos estos datos termodinámicos indican que las mutaciones ER, equivalentes a Val 38 y Gln 40 en gp41, impiden la interacción con la región C-terminal del péptido C34, y con el péptido Y24L, (péptido derivado de T20).

Además, parece claro que las moléculas de agua enterradas en esa región, presentes en la estructura cristalizada del complejo, son muy importantes. El cambio Glu por Val 10 o Arg por Gln 123, provoca que sus cadenas laterales rellenen la cavidad que ocupa la

molécula de agua, perturbando la red de interacciones que se llevan a cabo entre la molécula de agua y los aminoácidos próximos a ella.

Se han observado descensos de afinidad similares con mutantes V38D y V38E del constructo 5-Helix, que pierden afinidad por el péptido C37⁷⁶. Esto indica que la única mutación en V38 sería suficiente para generar resistencias.

Hemos hablado de que en la estructura del complejo también tenemos otra molécula de agua parcialmente enterrada, próxima a la región Gly 36. Es interesante que existan mutaciones Ser36, o Asp36 encontradas en cepas resistentes a T20⁵⁷, que podrían generar el mismo desplazamiento de otra molécula de agua interfacial. La cepa de pseudovirus pNL4.3 tiene un Asp 36 en vez de Gly, por lo que explicaría esa diferencia que observamos en la IC₅₀ de T20 y C34, tabla 3.2.

La contribución de las moléculas de agua y su influencia en la termodinámica de unión ya ha sido discutida^{87,88}. Nuestros resultados muestran que las interacciones con las moléculas de agua son importantes en los mecanismos de adquisición de resistencias. Además, los resultados apoyan la importancia de usar miméticos de NHR, como las proteínas covNHR como inhibidores, ya que presentan la región NHR se encuentra mucho más conservada que la región CHR.

3.4.3 CovNHR dirigidos a ENV nativas de VIH-1

Nuestros resultados muestran unión de las proteínas con diferentes tipos de ENV solubles. El grado de unión de la proteína covNHR-VQ es mayor que en covNHR-ER para todas las ENV probadas, de acuerdo con su mayor afinidad por CHR. Esto sugiere que las proteínas son capaces de interactuar con CHR sin necesidad de que la estructura de la ENV se modifique por la unión de CD4 y el correceptor. Un resultado similar se obtuvo para 5-Helix⁸⁹. Sin embargo, no podemos establecer con nuestros resultados que en esta unión produzca la inactivación de la ENV.

Conociendo la estructura de las moléculas de ENV estabilizadas y triméricas, figura 3.21⁹⁰, es difícil concebir la manera en la que las proteínas covNHR son capaces de interactuar con su diana en ellas. Particularmente, covNHR-ER, cuya secuencia diana de CHR se encuentra ocluida en mayor medida, ya que la zona más accesible es donde las mutaciones E10 y R123 impiden la interacción. Los dos restos de Trp que se unen al bolsillo hidrofóbico de NHR se encuentran ocluidos formando un collar alrededor de las regiones N- y C-terminal de gp120^{90,91}, lo que ayuda a mantenerla anclada a gp41. La

unión de CD4 soluble incrementa la exposición de las zonas más C-terminales de CHR, aunque no la de los aminoácidos que se unen al bolsillo hidrofóbico, ya que gp120 sigue anclada a gp41 y no permite la exposición de los Trp.

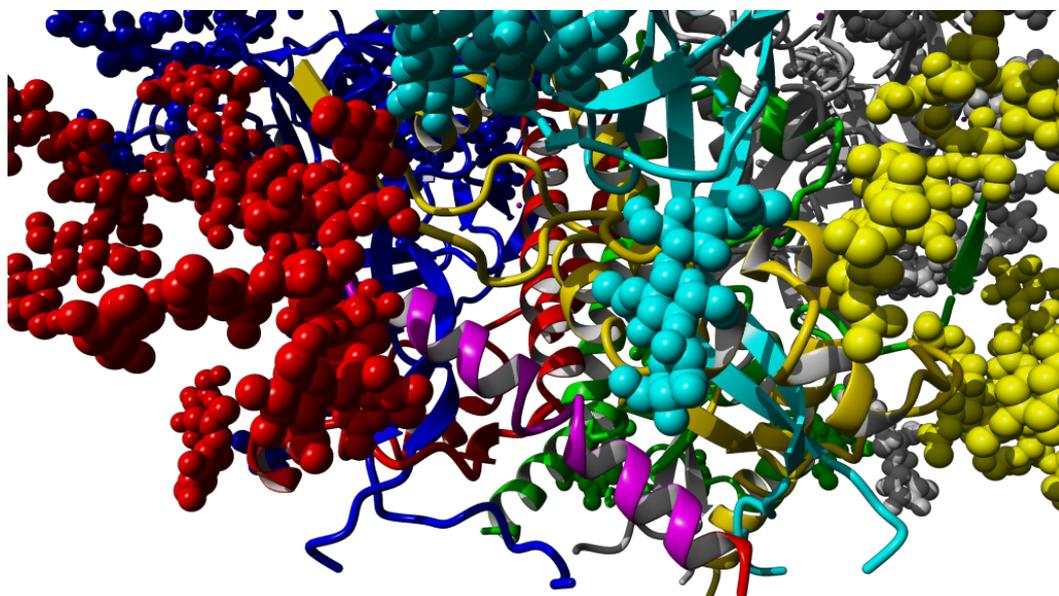


Figura 3.21. Parte de la estructura de ENV JR-FL soluble estabilizada con la región Fab del anticuerpo PGT151 obtenida por Crio-EM²⁶. Las esferas representan los glicanos asociados a gp120 y gp41. La hélice en fucsia representa parte de la región CHR. (PDB: 5FUU)

Además, las estructuras estabilizadas de la ENV son menos flexibles que las de los viriones nativos, aunque es posible que la región CHR esté más ocluida por la proximidad de la membrana. Se ha demostrado que las ENV de los viriones tienen una dinámica, llamada ‘breathing’ o respiración, que cambia entre conformaciones abiertas o cerradas, pudiendo ser seleccionadas ambas por ligandos^{92,93}.

Existen anticuerpos, como el 2F5 y 4E10 frente a MPER²⁵, o incluso la molécula de CD4 soluble capaces de desestabilizar la estructura de la ENV llegando a producir la liberación o ‘shedding’ de gp120^{52,94}. Es posible que las proteínas covNHR, al unirse a la región de Trp dónde interacciona gp120, compitan con ésta por dicha interacción, pudiendo provocar el ‘shedding’ de gp120, lo que daría lugar a un mecanismo alternativo de inhibición por nuestras moléculas. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio más exhaustivo del mecanismo de unión a las diferentes ENV en un futuro.

3.4.4 Las proteínas covNHR potentes inhibidores de VIH-1

Debido a que los motivos de unión al bolsillo hidrofóbico están muy conservados en la región CHR, las proteínas covNHR deberían tener una capacidad inhibidora elevada

frente a una gran variedad de cepas diferentes de VIH-1. Además, debido a ese mismo consenso, la aparición de resistencias asociadas a un posible tratamiento prolongado con este tipo de inhibidores va a presentar más dificultad. De hecho, si observamos la tabla 3.2, ambas proteínas presentan una capacidad inhibidora elevada frente a un panel de virus que cubren una amplia variedad genética de cepas de VIH-1⁷⁴.

A pesar de la fuerte reducción de afinidad que sufre covNHR-ER debido a sus mutaciones, su potencial inhibidor se mantiene elevado para una amplia variedad de cepas. Si lo comparamos con covNHR-VQ, su IC₅₀ es sólo de 2 a 5 veces menor, lo que implica que el sitio de resistencia a T20 no es necesario para alcanzar la inhibición de la fusión. De la misma forma, esa región de NHR puede ser sufriendo mutaciones sin producir cambios significativos en la capacidad de infección por el virus⁸⁴. Esto sugiere que la unión producida entre NHR y CHR no necesita ser continua a lo largo de todo el surco de interacción, ya que, aunque el sitio de resistencia a T20 impida un completo plegamiento de CHR, se podrá llevar a cabo la infección.

Por otro lado, la proteína covNHR-VQ tiene una extrema y reseñable afinidad por C34 que puede ser muy útil, ya que una unión tan afín a motivos altamente preservados en CHR de ENV de virus nativos puede limitar la aparición de cepas resistentes de VIH-1. No obstante, este enfoque necesita ser estudiado con mayor detenimiento.

3.5 Conclusiones

- Las proteínas covNHR tienen una elevada estabilidad y mimetizan con gran precisión la superficie de contacto del trímero nativo de gp41 formado por las hélices NHR.
- Las mutaciones V10E y Q123R, en la región de aparición de resistencia a T20, provocan una disrupción local de la interacción con la región CHR, aunque la afinidad de la proteína mutante se mantiene en el rango nanomolar.
- Dos moléculas de agua interfacial juegan un papel clave en las interacciones relacionadas con la aparición de resistencia a los péptidos CHR.
- A pesar de la dramática reducción de afinidad por su diana, ambas proteínas poseen una potente capacidad inhibidora frente a un amplio abanico de cepas del VIH-1, incluyendo cepas resistentes a T20.
- Estas proteínas son modelos de estudio extremadamente útiles para investigar los determinantes moleculares de la inhibición de la fusión dirigida a gp41.
- Sus características biofísicas y su capacidad inhibidora las destaca como posibles inhibidores de fusión con amplias ventajas comparadas con los inhibidores derivados de CHR y dirigidos a NHR.
- Son un buen punto de partida para el desarrollo de nuevas estrategias dirigidas a la obtención de inhibidores de fusión miméticos de la región NHR frente a gp41 en su estado pre-fusión.

Capítulo 4:

Caracterización termodinámica de las interfases de interacción NHR-CHR en gp41

4.1 Introducción

En el capítulo anterior hemos descrito la proteína covNHR-VQ como un mimético muy preciso de la superficie de interacción de la región NHR de gp41, que posee una afinidad muy elevada por péptidos derivados de la región CHR y que, además, tiene una amplia y potente actividad inhibidora por diversas cepas del VIH-1 en ensayos in vitro. Sabiendo que existen numerosos estudios de compuestos peptídicos y moléculas pequeñas que tienen como diana las regiones de interacción en NHR, hemos utilizado la proteína covNHR-VQ como base de un estudio termodinámico preciso de los determinantes de unión en esta región de la proteína gp41. De esta forma, hemos podido acotar los puntos de interacción más destacables, para poder usarlos como regiones sobre las que centrarse a la hora del diseño racional de inhibidores de alta afinidad. Esta información será de utilidad para el diseño de nuevas proteínas más eficientes en cuanto a la relación tamaño/afinidad, ya que una reducción del tamaño molecular de la proteína, manteniendo una alta afinidad por la región CHR diana, podría conducir al diseño de proteínas inhibidoras más efectivas.

El trímero de NHR presenta dos cavidades bien diferenciadas, que hemos podido estudiar gracias a la proteína mimética covNHR-VQ. Estas regiones permiten una unión tremendamente afín a la región CHR presente en el péptido C34 ($K_d \sim 0,08 \text{ pM}$), el bolsillo hidrofóbico (HP), y el bolsillo N-terminal (NTP). Además, entre ambas cavidades existe un bolsillo intermedio (IP) de contacto con varios restos hidrofóbicos del péptido, como observamos en la figura (4.1), y una pequeña cavidad en el extremo C-terminal de la proteína que podría interactuar con aminoácidos de la región CHR^{95,96} anteriores a los que se insertan en el bolsillo hidrofóbico, situados en el extremo N-terminal de la secuencia CHR.

Estos residuos de la secuencia CHR juegan un papel importante en la afinidad y la entalpía del proceso de unión NHR-CHR, ya que la energía liberada en la interacción se recicla y utiliza durante la última etapa del proceso de fusión⁴⁴.

Para caracterizar la contribución de cada región de NHR a la afinidad de la interacción, diseccionamos la región CHR, dividiéndola en péptidos de diferente longitud que contienen las secuencias de aminoácidos que interactúan en las diferentes regiones antes mencionadas de nuestra proteína.

Para comprobar si los péptidos son capaces de unirse o no a la proteína utilizamos 3 técnicas diferentes. Primero realizamos medidas de dicroísmo circular en el UV lejano

(200-260 nm). Como ya hemos visto en el capítulo anterior, los péptidos CHR adquieren estructura secundaria en α -hélice al interactuar con la proteína, por lo que, si observamos un aumento de α -hélice en el complejo con respecto a la proteína libre, podemos confirmar unión desde el punto de vista cualitativo.

También sabemos que la proteína tiene un triptófano presente en el bolsillo hidrofóbico, además de otros aminoácidos aromáticos como las tirosinas. Usando medidas de dicroísmo circular en el UV cercano (250-350 nm) podemos obtener información del apilamiento de los triptófanos presentes en la secuencia CHR cuando interactúan con el Trp del bolsillo hidrofóbico (aquellos que se unan en esa región), como se mostró en el capítulo anterior con la señal a los 293 nm producida por la unión de C34 a las proteínas covNHR^{72,97}. De los péptidos que no contengan los Trp que permitan ver esa señal no se podrá obtener información mediante Near-UV CD.

Una vez caracterizada estructuralmente la unión de dichos péptidos, realizamos experimentos de calorimetría isotérmica de titulación (ITC), con la que se cuantificó termodinámicamente las uniones péptido-proteína.

4.2 Objetivo

Disecionar la termodinámica de unión de los bolsillos de unión presentes en la proteína covNHR-VQ, con el fin de desentrañar cuáles son las interacciones indispensables entre NHR-CHR que permiten obtener unos parámetros de afinidad suficientemente altos como para desarrollar su actividad inhibidora. Asimismo, la identificación de dichas interacciones permitirá seleccionarlas como posibles puntos estratégicos (“hot spots”) para orientar el diseño de fármacos de molécula pequeña que puedan constituir inhibidores de fusión.

4.3 Resultados

Como ya hemos mencionado, las superficies de interacción de covNHR-VQ con la región CHR se pueden dividir en: bolsillo hidrofóbico, en el que interaccionan Trp 628, Trp 631 e Ile 635; un bolsillo polar N-terminal, en el que Gln 653 y Asn 656 forman una red de puentes de hidrógeno con una molécula de agua conservada (ver Capítulo anterior); un bolsillo intermedio menos profundo donde interaccionan Ile 642, Leu 645 e Ile 646; y una región C-terminal donde se ha postulado que interacciona Asn 624⁹⁸ (Figura 4.1).

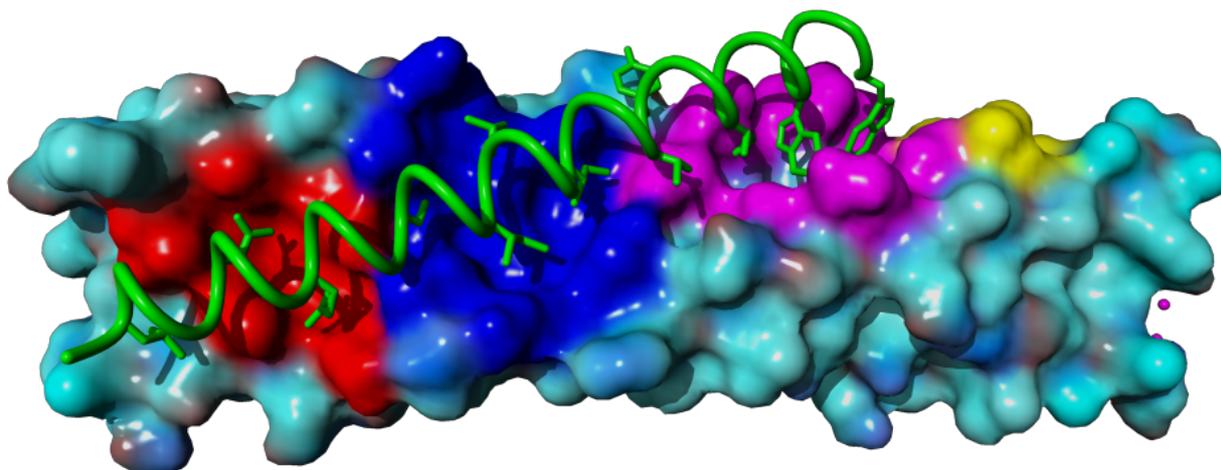


Figura 4.1. Representación de los contactos entre las regiones NHR y CHR entre covNHR-VQ (representada en superficie expuesta a disolvente) y C34 (en verde). En amarillo se representa la zona de contacto del bolsillo C-terminal, en magenta se destaca los aminoácidos que forman el bolsillo hidrofóbico, en azul la zona del bolsillo intermedio y en rojo donde se producen los contactos en el bolsillo N-terminal.

Una vez los péptidos de la región CHR se estructuran en α -hélice la disposición de sus cadenas laterales y su contacto con la región NHR complementaria dependerá de la posición del aminoácido dentro de la estructura de la hepta-repetición. Sin embargo, un análisis detallado de las interacciones en las estructuras postfusión de gp41 permite observar que la interacción NHR-CHR no responde a una interacción coiled-coil canónica, sino que presenta una discontinuidad (stutter) consistente en una supresión de 3 residuos en una de las hepta-repeticiones, de forma que se produce un cambio en la periodicidad (tabla 4.1). La presencia de esta discontinuidad desplaza la cadena lateral de Ile 642, en (posición a) al centro del core del coiled-coil y produce un desplazamiento del resto Leu 645 (posición d) hacia el exterior, desplazando el resto siguiente Ile 646 desde su posición e a la nueva posición a. Esto produce un empaquetamiento local conocido como x-da en el bolsillo intermedio⁹⁹. La importancia de esta discontinuidad en la interacción NHR-CHR es desconocida.

4.3.1 Clasificación de los péptidos según el número de regiones con las que interactúan

Podemos clasificar los péptidos utilizados en este estudio en dos grupos diferentes, péptidos que interactúan con una única región de la proteína y con más de una región:

- Grupo péptidos que interactúan con una región: W13S, Y14N, E14L. El W13S con el HP, el Y14N con la IP, y el E14L con el NTP.
- Grupo de péptidos que interactúan con dos regiones o más: C34, N36N, W24N, Y24L, N25S. Los péptidos C34 y N36N puede interactuar con 3 regiones, C34 con el HP, el IP y el NTP, y el N36N con el HP, el IP, y la región C-terminal de la proteína. Los otros tres péptidos interactúan con 2 regiones. N25S con la región C-terminal y el HP, el W24N con el HP y el IP y el Y24L con el IP y el NTP.

Para eliminar la influencia de las cargas de los extremos N y C de cada péptido, todos ellos se acetilaron en su extremo N-terminal y se amidaron su el extremo C-terminal. Además, las secuencias de péptidos dirigidos a bolsillos contiguos se eligieron con un solapamiento de 3 ó 4 residuos para reducir la influencia de los puentes de hidrógeno ausentes en los extremos de la hélice.

Tabla 4.1 Secuencia de péptidos CHR utilizados para caracterizar la unión

Péptidos CHR	Secuencia de aminoácidos
	⁶²³ WNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE ⁶⁶³
C34	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL
N36N	NKSLEQIWNNMTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQN
W24N	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQN
Y24L	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL
N25S	NKSLEQIWNNMTWMEWDREINNYTS
W13S	WMEWDREINNYTS
Y14N	YTSLIHSLIEESQN
E14L	ESQNQQEKNEQELL

4.3.2 Análisis de unión covNHR y péptidos CHR por CD

4.3.2.1 Dicroísmo Circular en el UV lejano. 200-260 nm

Estos experimentos se realizaron como una caracterización cualitativa del grado de unión de cada péptido a la proteína covNHR-VQ. Para ello, a una disolución de proteína a pH

7,4, en tampón NaPi, con una concentración de 15 μM , se le añadió cada péptido en una relación molar 1:2 (proteína:péptido), a fin de comparar los datos con la unión del péptido C34⁹⁷.

Con las medidas de FAR-UV CD a 25 °C, teniendo como referencia la proteína libre, y la suma de los espectros individuales del péptido C34 y la proteína, podemos registrar el grado de formación de hélice α con la unión.

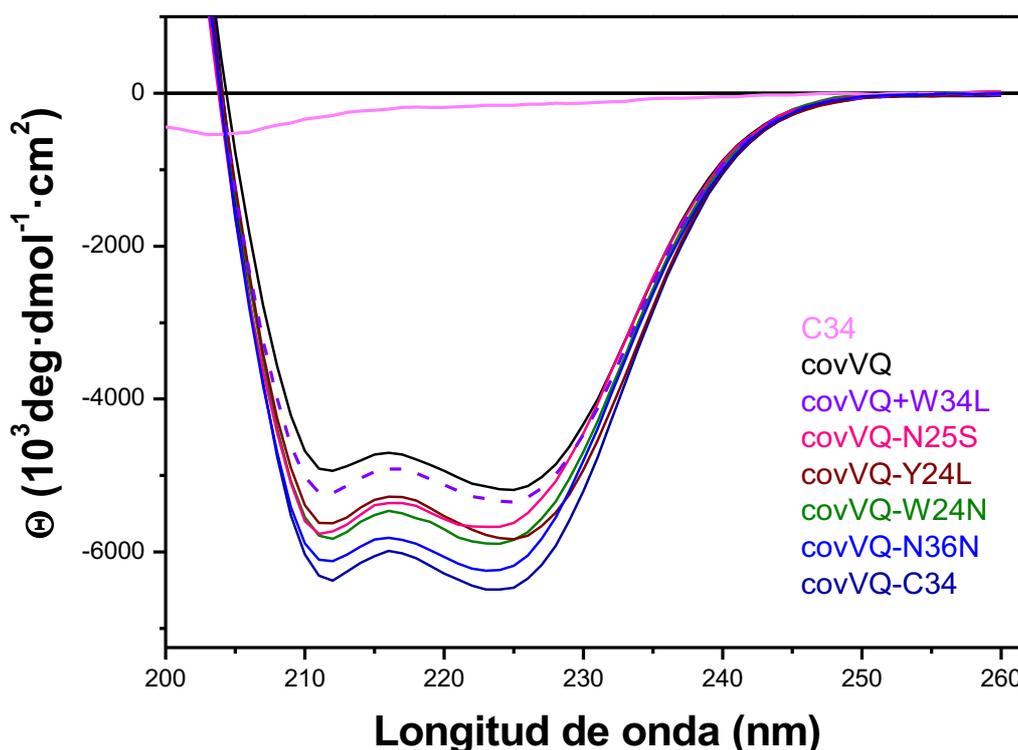


Figura 4.2. Espectros de Far-UV CD de los péptidos CHR que interaccionan en más de una región con la proteína covNHR-VQ.

Si observamos la figura 4.2, existe un aumento en la señal de elipticidad molar negativa con la unión de los péptidos N25S, W24N, Y24L, C34 y N36N. El aumento de estructura en hélice depende del número de aminoácidos de cada péptido, aunque con ciertas variaciones. Es decir, el complejo covNHR-VQ/W24N, tiene menos elipticidad que el formado con el complejo covNHR-VQ/C34, sin embargo, el complejo con el péptido N36N tiene una elipticidad algo menor que el complejo con C34, lo que sugiere un menor grado de estructura.

Por el contrario, como observamos en la figura 4.3, en presencia de los péptidos W13S, E14L e Y14N no se producen cambios significativos en el espectro de CD, lo que indica

que estos péptidos no se unen o se unen muy débilmente a la proteína en estas condiciones, aún teniendo algunos de ellos, como el W13S, los determinantes de unión al bolsillo hidrofóbico. Aunque para un mayor discernimiento de la interacción, cabría observar la figura 4.4.

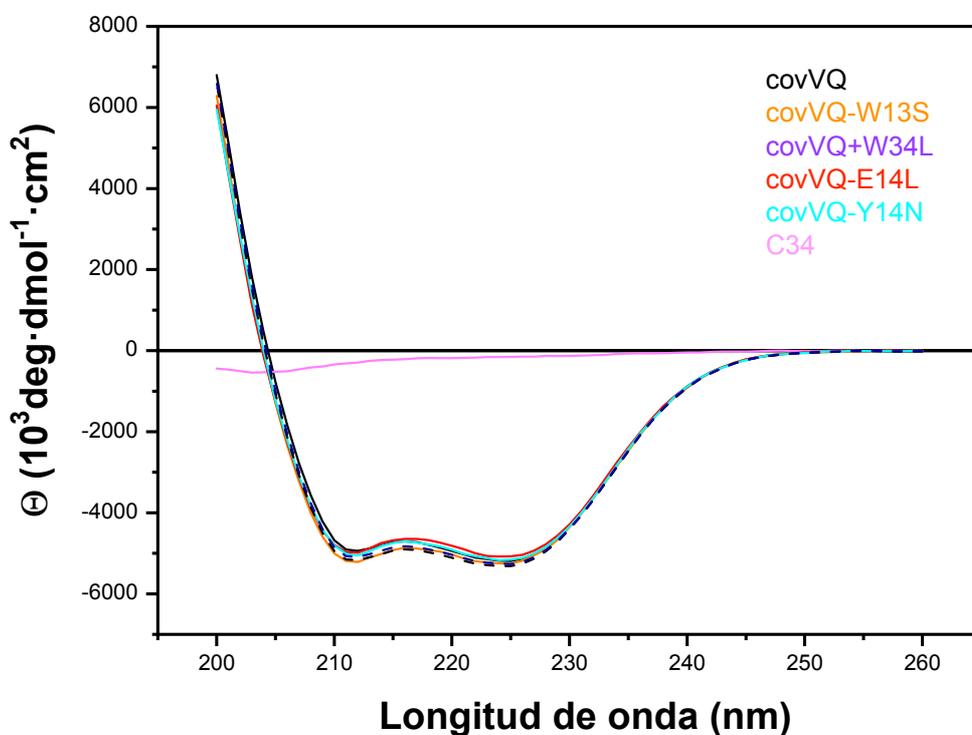


Figura 4.3. Espectro de Far-UV CD de los péptidos CHR cortos con la proteína covNHR-VQ.

La figura 4.4 muestra la elipticidad resultante al sustraer la elipticidad a 222 nm obtenida para cada complejo proteína-péptido si le sustraemos el valor teórico que darían los espectros de proteína y el péptido si no interaccionasen. De esta manera queda claro que los péptidos que podrían interaccionar con dos o más regiones se unen a la proteína, ya que la elipticidad negativa del complejo es mayor que la de la suma teórica, dando un valor negativo en el diferencial que corresponde a un incremento en la estructura en hélice α . Mientras tanto, los péptidos cortos como el W13S, E14L e Y14N no parecen mostrar unión significativa, ya que el valor teórico es igual o incluso ligeramente superior al experimental, generando valores positivos en la diferencia o muy próximos a 0.

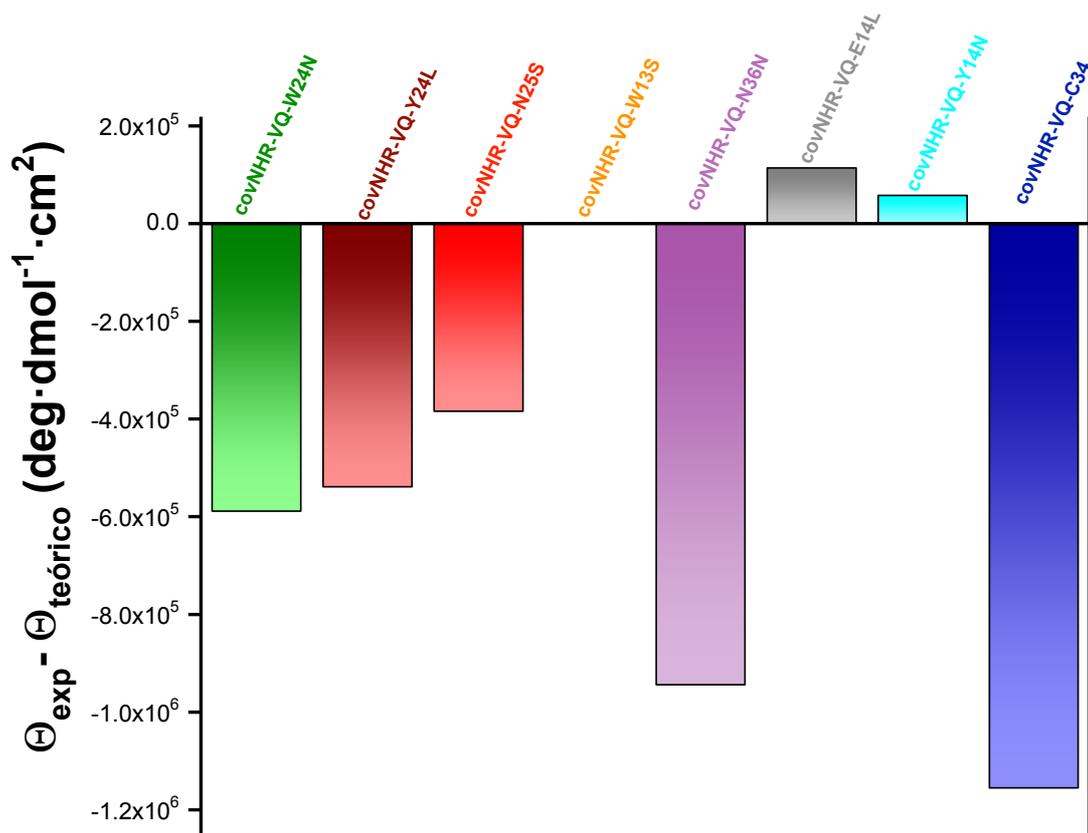


Figura 4.4 Gráfico de la diferencia de elipticidad a 222 nm entre el valor del complejo proteína-péptido obtenido experimentalmente con el dato de elipticidad calculado teóricamente al sumar la elipticidad de la proteína y cada péptido.

4.3.2.2 Dicroísmo circular en el UV cercano. 250-350 nm

El bolsillo o cavidad hidrofóbica de la región NHR interviene de manera destacada en la interacción de los triptófanos presentes en algunos péptidos CHR. Por este motivo experimentos de NEAR-UV CD nos pueden dar información de dónde se produce parte de la interacción covNHR-VQ-péptidos.

Como sabemos de la figura 4.1, no todos los péptidos tienen el determinante de unión al bolsillo hidrofóbico. Usando medidas de NEAR-UV CD podemos determinar la unión de los péptidos a la cavidad hidrofóbica.

La proteína libre presenta una señal débil de NEAR-UV CD en torno a los 280 nm, correspondiente al triptófano 571 presente en el bolsillo hidrofóbico y a otros restos aromáticos como Tyr presentes. Si se produce unión en dicha región, la señal de CD cambia, ya que se produce un clúster entre dicho triptófano y los triptófanos 628 y 631 del péptido que finalmente producen una banda negativa característica con un mínimo a 293 nm y una banda positiva a longitudes de onda menores (255-280 nm). Por lo que, si

observamos las figuras 4.5 y 4.6, apreciamos que sólo aquellos péptidos que tienen los triptófanos capaces de interactuar con el bolsillo hidrofóbico muestran un pico de elipticidad a los 293 nm.

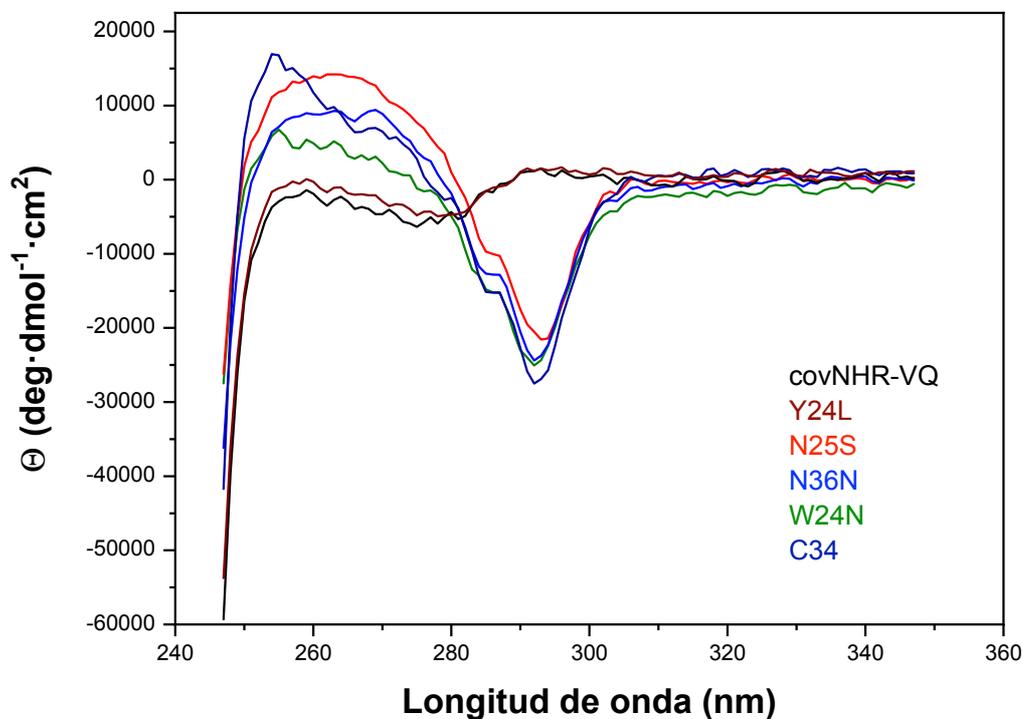


Figura 4.5. Espectros de Near-UV CD de los péptidos CHR con más de una zona de interacción con la proteína covNHR-VQ.

El péptido W13S es una excepción ya que, aún teniendo los triptófanos en su secuencia, no presenta dicha señal, dato que corrobora que no observemos unión en el FAR-UV CD. Sin embargo, el espectro de NEAR-UV CD de la mezcla covNHR-VQ y W13S no es idéntico al de la proteína libre. Existe una variación en la región de 277-260 nm, que indica un cambio en el entorno de los aminoácidos aromáticos de la proteína y puede sugerir cierta interacción por parte del péptido.

El resto de mezclas de la proteína con los péptidos, N25S, N36N y W24N muestran una señal muy parecida entre ellos, aunque la intensidad de dicha señal varía ligeramente, debido probablemente a diferencias en la afinidad que tienen los péptidos por la proteína.

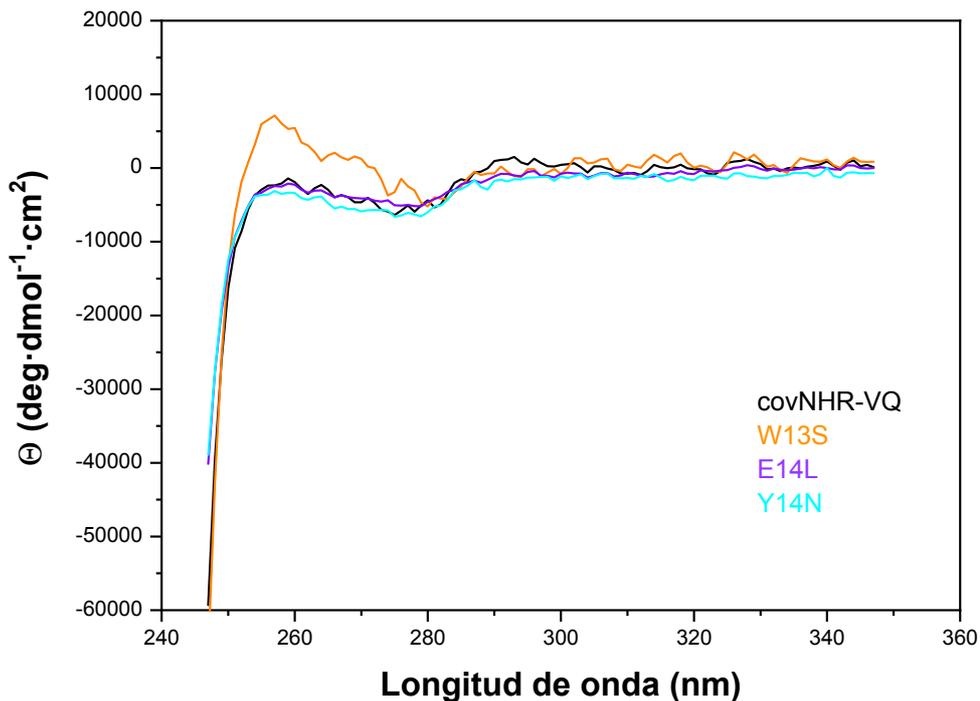


Figura 4.6. Espectros de Near-UV CD de los péptidos CHR de una región de interacción con la proteína covNHR-VQ.

Como hemos visto en el capítulo anterior y de acuerdo con los resultados de FAR-UV CD, el péptido Y24L interacciona con la proteína, pero al no unirse al bolsillo hidrofóbico, tabla 4.1, no se observa la banda de CD a 293 nm.

4.3.3 Caracterización termodinámica por ITC

Una vez caracterizada estructuralmente la unión de los diferentes péptidos a la proteína, realizamos experimentos de calorimetría isotérmica de titulación (ITC) para obtener las magnitudes termodinámicas de la unión de cada péptido en estudio. Para aquellos péptidos con los que no se observó unión significativa por FAR-UV CD o NEAR-UV CD se realizaron experimentos de ITC de desplazamiento (útiles para aquellas interacciones de muy alta afinidad, así como para interacciones muy débiles), con el fin de cuantificar o descartar cualquier tipo de unión de baja afinidad.

4.3.3.1 Ensayos directos ITC

Con los péptidos W24N, Y24L, N36N, se realizaron titulaciones directas para determinar su entalpía de unión y su afinidad, como vemos en las figuras 4.7-4.9. Los péptidos interaccionan con la proteína con una estequiometría de aproximadamente 1.

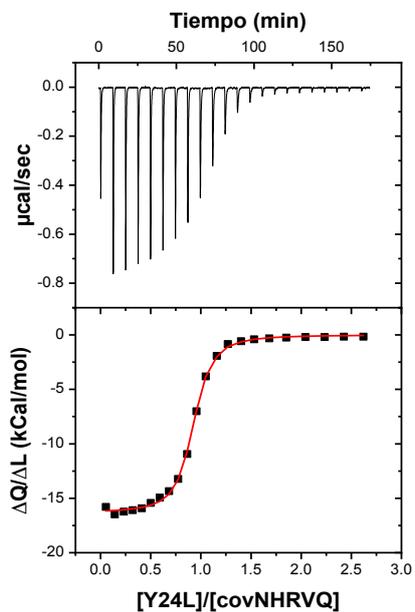


Figura 4.7. Ensayo ITC directo covNHR-VQ-Y24L a 25°C

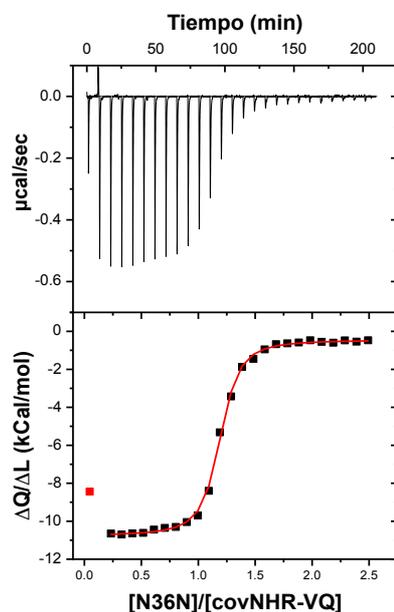


Figura 4.8. Ensayo ITC directo covNHRVQ-N36N a 25°C

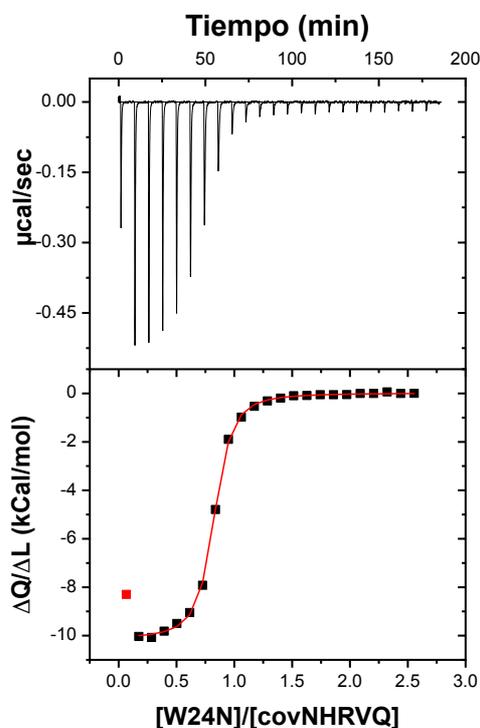


Figura 4.9. Ensayo ITC directo covNHR-VQ-W24N a 25°C

La entalpía de unión para los tres péptidos es superior a las 10 kcal·mol⁻¹. No hay una gran diferencia de entalpía entre la interacción de N36N y W24N, aún teniendo el N36N 12 aminoácidos más que permitirían la interacción con la región C-terminal, mientras que la unión de Y24L con la proteína tiene una entalpía bastante más negativa que los otros dos. Sobre estos datos profundizaremos más adelante.

4.3.3.2 Ensayos ITC de desplazamiento

En el caso del péptido N25S, aunque aparentemente los datos de FAR-UV y NEAR-UV CD indican que su afinidad es del orden de μM y, por lo tanto, un ensayo de ITC directo debería darnos sus parámetros de unión, la baja solubilidad de este péptido y sus problemas de agregación a concentraciones superiores a 150 μM impidieron las titulaciones directas reproducibles.

Por tanto, para los péptidos N25S, W13S, Y14N y E14L se realizaron experimentos de desplazamiento⁶⁶, en los que se sitúa en la celda del calorímetro una mezcla de la proteína y el péptido de baja afinidad y se realiza la titulación con un péptido de mayor afinidad, que desplaza al primero del complejo. Para la proteína se utilizó una concentración de 10 μM y para los péptidos W13S, Y14N y E14L se usaron concentraciones en célula de 300-650 μM ya que, si interaccionasen con la proteína, su afinidad y entalpía tendrían unos valores muy reducidos, por lo que necesitaríamos ratios proteína:péptido elevados para ver alguna diferencia. Una diferencia en los valores aparentes de K_d y ΔH de unión con respecto al experimento directo de la proteína y el péptido de mayor afinidad, que se toma de referencia, significará que existe una competición entre los péptidos de baja afinidad y los de alta afinidad, pudiendo extraer de estos experimentos los parámetros termodinámicos de unión de los péptidos que en un principio parecían no interaccionar con la proteína. Para los experimentos de desplazamiento con péptidos de baja afinidad o poca solubilidad que interaccionan con el bolsillo hidrofóbico o el bolsillo C-terminal, se selecciona como péptido de alta afinidad el W24N, que presenta una afinidad alta, sin ser extrema como la del péptido C34. Para los péptidos de baja afinidad que interaccionan con el bolsillo intermedio o el bolsillo N-terminal, se realizan los experimentos de competición con Y24L.

Realizando un análisis global de las titulaciones podemos extraer los parámetros termodinámicos que presenta los péptidos de menor afinidad.

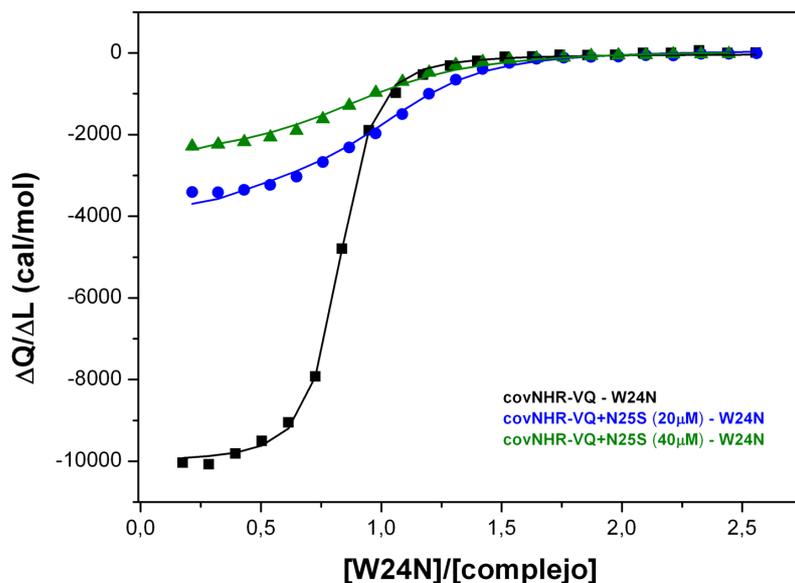


Figura 4.10. Ajuste global de los experimentos de ITC de desplazamiento del péptido N25S con W24N.

Como podemos observar en la figura 4.10, existe una variación de entalpía y afinidad en la titulación del péptido cuando la proteína está formando un complejo con el péptido N25S. Con lo que podremos extraer su afinidad y entalpía de unión.

Si observamos las figuras 4.11 y 4.12, éstas muestran la competición de dos de los péptidos que sólo presentan un único sitio de unión. En el caso de E14L (datos no mostrados) e Y14N, figura 4.12, no existe variación significativa entre el experimento de ITC directo con el péptido de mayor afinidad y el experimento de desplazamiento. Estos datos unidos a los obtenidos por dicroísmo circular indican que no existe interacción de dichos péptidos con la proteína. Sin embargo, si nos fijamos en los experimentos de desplazamiento realizados con el péptido W13S, figura 4.11, sí que existen diferencias suficientes como para obtener sus parámetros de interacción mediante un ajuste global.

Por lo que el péptido W13S, cuya secuencia tiene los determinantes de unión al bolsillo HP, es capaz de interactuar con la proteína, aunque de manera muy débil. Mientras que los péptidos que contienen las secuencias de unión al bolsillo IP, Y14N, y al bolsillo NTP, E14L, no son capaces de interactuar con la proteína.

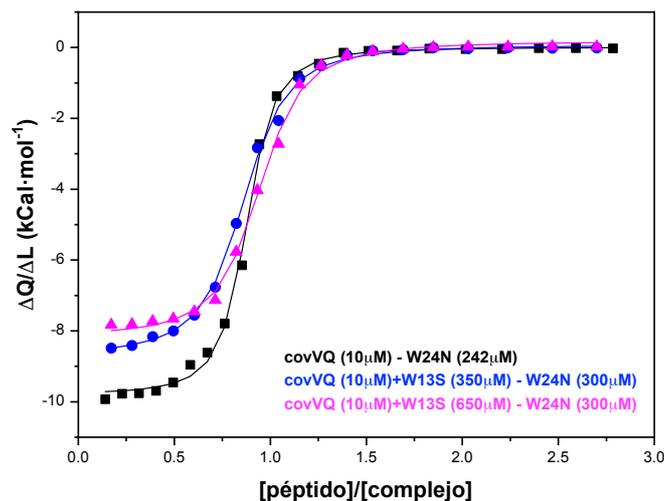


Figura 4.11. Ajuste de los experimentos de ITC de desplazamiento del péptido W13S con W24N.

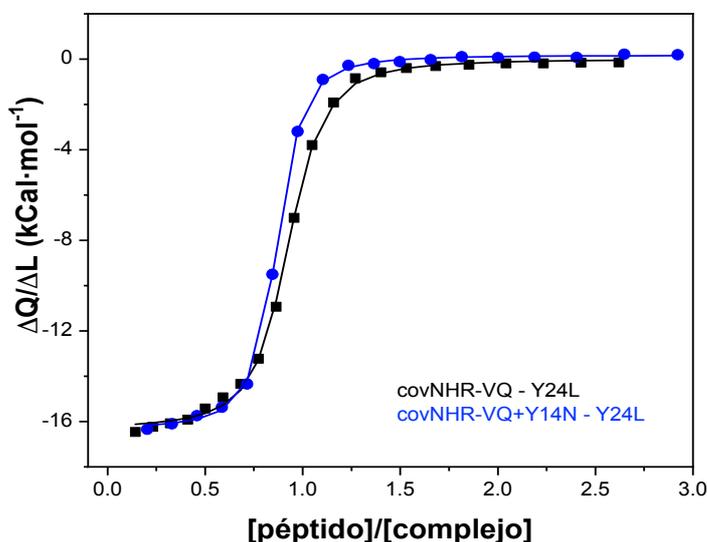


Figura 4.12. Ajuste de los experimentos de ITC de desplazamiento del péptido Y14N.

4.3.3.3 Cálculo del incremento de capacidad calorífica de unión

Además de la entalpía y la afinidad, utilizamos los experimentos de ITC para calcular el incremento de capacidad calorífica de unión (ΔC_{p_b}), ensayando la unión de los péptidos a diferentes temperaturas. Comparamos los ΔC_{p_b} de los péptidos que tienen dos sitios de interacción, cuya suma abarca toda la zona de interacción entre NHR y CHR. El N25S, W24N e Y24L.

Para calcular el ΔC_p de unión realizamos ensayos de interacción proteína-péptidos variando la temperatura entre 20-35°C. En el caso del péptido N25S, se realizaron

experimentos de desplazamiento a diferentes temperaturas y su ΔH de unión se calculó mediante el ajuste global para cada temperatura.

Como observamos en la figura 4.13, a medida que aumenta la temperatura, la ΔH aumenta, se vuelve más negativa. Estos datos se ajustan a una regresión lineal en la que la pendiente de la recta es el valor de ΔC_{pb} . Para todos los péptidos la pendiente que adquiere la recta es negativa, dato que era el esperado, ya que la interacción péptido-proteína está dominada fundamentalmente por interacciones hidrofóbicas, como ya hemos visto con anterioridad. Sin embargo existen diferencias cualitativas, ya que la pendiente de W24N es más negativa si lo comparamos a N25S e Y24L.

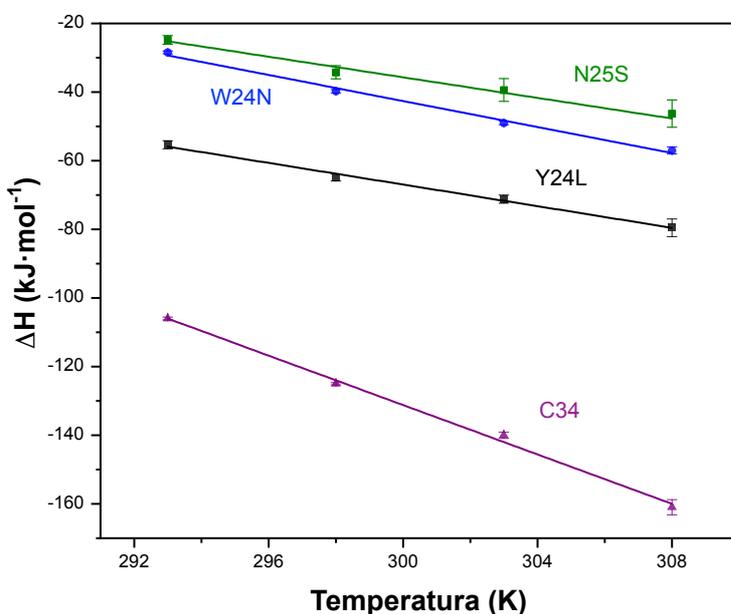


Figura 4.13. ΔC_p de los péptidos C34, W24N, N25s e Y24L.

4.3.4 Resumen termodinámico de los parámetros obtenidos

En la tabla 4.2 comparamos los parámetros termodinámicos obtenidos en los experimentos directos de unión, así como los obtenidos por desplazamiento. Los parámetros se comparan con los obtenidos para la unión de C34, que se describieron en el capítulo anterior.

Tabla 4.2. Parámetros termodinámicos de unión de los péptidos CHR con la proteína covNHR-VQ

Péptidos	Temperatura (°C)	Kd (μM)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	N	ΔCp (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
C34	25	< 1 pM	-126	0,8	-3,6 ± 0,1 ¹
N36N	25	0,063 ± 0,012	-43 ± 0,8	1,2	
W24N	20	0,06 ± 0,01	-29 ± 0,4	0,98	-1,9 ± 0,1
	25	0,08 ± 0,007	-41 ± 0,4	0,83	
	30	0,10 ± 0,01	-49 ± 0,5	0,93	
	35	0,13 ± 0,02	-57 ± 1	0,95	
Y24L	20	0,08 ± 0,02	-55,4 ± 1,2	0,98	-1,6 ± 0,1
	25	0,09 ± 0,007	-63 ± 1	0,83	
	30	0,11 ± 0,02	-71,3 ± 1,2	0,93	
	35	0,2 ± 0,03	-80 ± 2,6	0,95	
N25S	20	2,7 ± 0,8	-25 ± 1,3	1	-1,5 ± 0,2
	25	3 ± 1	-34 ± 2	1	
	30	17 ± 8	-39 ± 3,3	1	
	35	27,2 ± 15	-46 ± 4	1	
W13S	25	330 ± 150	-11 ± 3	1	
Y14N	25	SIN INTERACCIÓN			
E14L	25	SIN INTERACCIÓN			

En rojo se señalan los péptidos cuyos parámetros se obtuvieron por ITC de desplazamiento.

Los parámetros se obtuvieron mediante ajustes a un modelo de interacción 1:1.

Los errores se obtuvieron mediante un intervalo de confianza del ajuste del 95%.

En la figura 4.14 vemos el perfil termodinámico de la unión a 25°C en energía de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS). Sabiendo que $\Delta G = -RT \cdot \ln K_a$, y $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Tomando como referencia la unión del péptido C34⁹⁷, descrita en el capítulo anterior, las afinidades son menores con el resto de péptidos, es decir, su Kd se ve aumentada en varios órdenes de magnitud. El péptido C34, que posee una afinidad sub-picomolar, tiene como característica principal en su secuencia los aminoácidos capaces de interactuar con las

tres cavidades más destacadas simultáneamente, el bolsillo hidrofóbico, el bolsillo intermedio y el bolsillo polar.

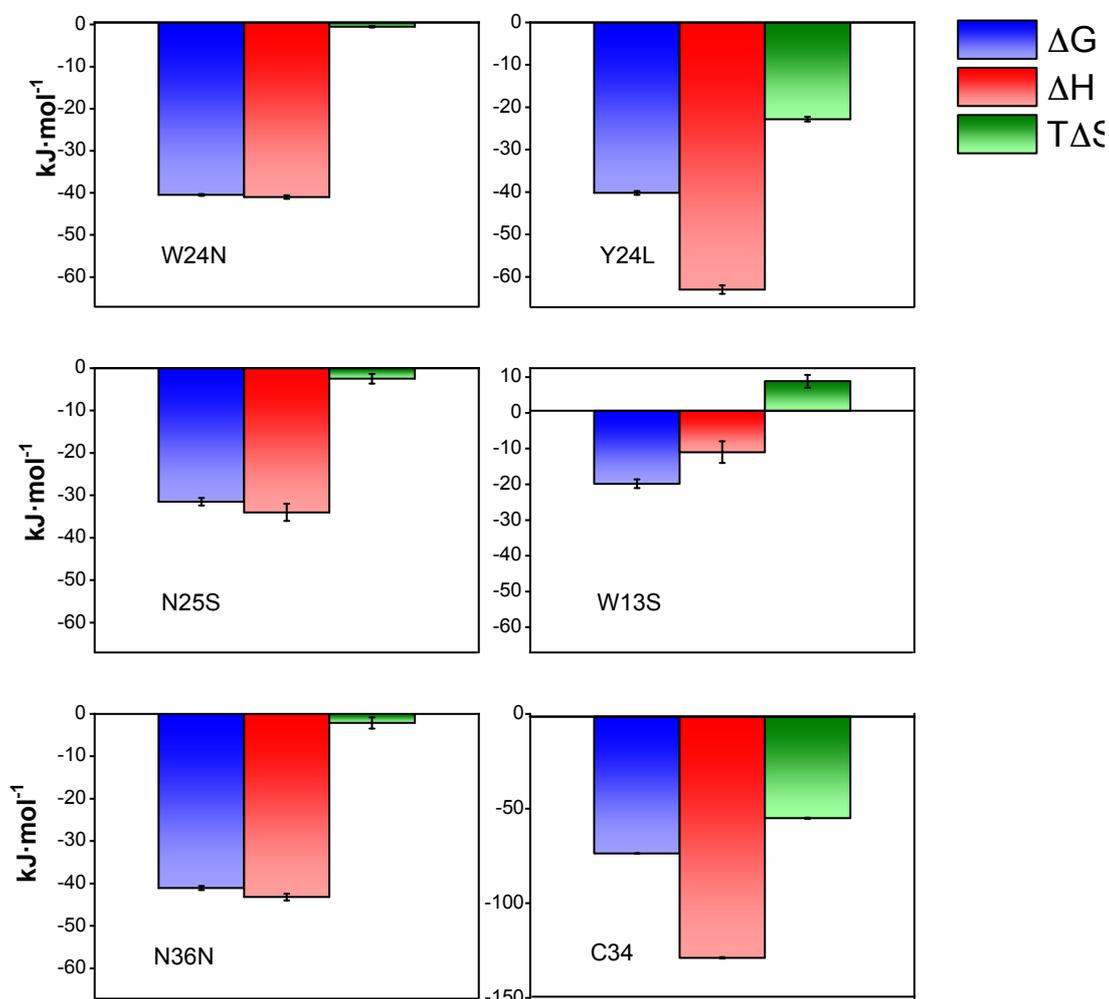


Figura 4.14. Perfil termodinámico de unión de los péptidos CHR a la proteína.

Mientras que, los péptidos W24N, N36N e Y24L, con afinidades en el rango nM, entre 30-90 nM, presentan los determinantes de unión a sólo dos de esos tres bolsillos. Una mención especial necesita el N36N, ya que su secuencia contiene, además, la zona N-terminal de la región CHR que interacciona con la proteína en región anterior al bolsillo hidrofóbico en su extremo C-terminal. Sin embargo, en nuestro estudio la presencia de esa región no favorece un incremento de afinidad muy reseñable si lo comparamos con el péptido W24N, con el que comparte los 24 aminoácidos C-terminales. Además, las entalpías de unión son muy parecidas, con sólo un ligero incremento en la entalpía de unión negativa ($2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) compensado en parte por una entropía de unión ligeramente más negativa también, lo que indica que los 12 aminoácidos adicionales en N36N establecen interacciones poco significativas con la región C-terminal. Sin embargo, si

comparamos los parámetros termodinámicos de N25S y W13S, vemos que, en este caso, el añadir los 12 aminoácidos, deriva en un aumento de 100 veces en la afinidad y un incremento en la entalpía de unión favorable de $23 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. La diferencia entre N25S y N36N es la presencia en el último de secuencia que interacciona con el bolsillo IP, que parece estar influyendo en estas diferencias.

Además, parece claro que el bolsillo IP adquiere un papel clave en la obtención de afinidades del rango nanomolar, ya que el péptido N25S, aún teniendo dos regiones de interacción, tiene una K_d de $3 \mu\text{M}$, mientras que los otros péptidos con dos regiones de interacción, W24N e Y24L, tienen una K_d aproximadamente 50 veces inferior.

Si comparamos los valores de los ΔC_p de unión de los tres péptidos con dos regiones de interacción vemos que son similares. W24N tiene un ΔC_p de $-1,9 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, mientras que Y24L y N25S tienen ΔC_p similares de $-1,6$ y $-1,5 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Esto está de acuerdo con una interfase de unión más hidrofóbica (bolsillos HP e IP) en la interacción de W24N, mientras que la interfase de unión de Y24L implica al bolsillo NTP, de carácter marcadamente polar. Por el contrario, N25S tiene un ΔC_p de unión similar a Y24L, a pesar de que interacciona con el bolsillo HP. Esto puede deberse a que las posibles interacciones en la región C-terminal tienen también un cierto carácter polar, siendo además menos entálpicas, lo que contribuiría al menor ΔC_p .

Si, por el contrario, nos fijamos en el péptido W13S, que sólo presenta los aminoácidos que interaccionan con el bolsillo HP, su K_d es $330 \mu\text{M}$, lo que indica que sólo la interacción NHR-CHR exclusiva del bolsillo hidrofóbico, no genera unas afinidades lo suficientemente relevantes. Ahora bien, el Y14N y el E14L que teóricamente interaccionan con el bolsillo intermedio y el bolsillo polar, respectivamente, no presentan una unión significativa con la proteína. Esto indica que las interacciones individuales en cada uno de estos bolsillos no son energéticamente suficientes para establecer una afinidad significativa.

Los resultados mostrados sugieren que existe una relación cooperativa entre las interacciones en los diferentes bolsillos de unión que, además, se acentúa especialmente al incluirse las interacciones en los tres bolsillos principales (HP, IP, NTP), ya que, como observamos en la tabla 4.2, la K_d del péptido C34, que interacciona con los tres bolsillos, es extremadamente baja y su entalpía y capacidad calorífica de unión muy negativas.

Si nos fijamos en los valores de ΔG mostrados en la figura 4.15, la energía liberada en el proceso de interacción entre la proteína y los péptidos N36N, W24N e Y24L, es muy

parecida.

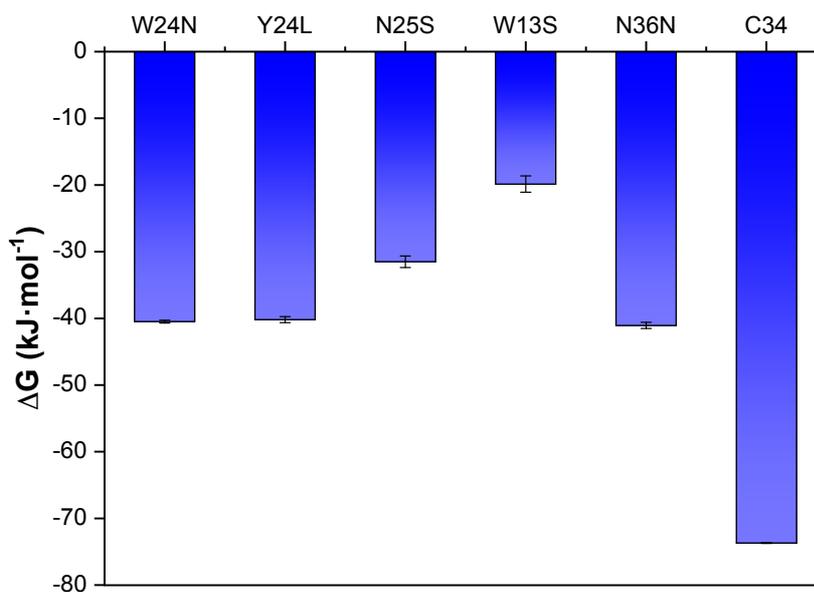


Figura 4.15. Comparación valores ΔG obtenidos en la interacción péptidos:proteína.

Sin embargo, si esa comparación la realizamos para la entalpía, ΔH , figura 4.16, vemos claramente como el péptido Y24L presenta una entalpía con un valor exotérmico mayor que la del péptido N36N, que es 12 aminoácidos más largo; y prácticamente un tercio mayor a la entalpía liberada por la interacción con W24N, cuya longitud es la misma. Por lo que, si ΔG es igual o prácticamente igual para ambos casos significa que existe un efecto compensatorio entrópico en el caso de Y24L.

Como vemos en la figura 4.17, el péptido Y24L tiene un efecto entrópico mayor que N36N y que W24N. Suponiendo que los péptidos antes de la interacción están en una conformación desplegada, y que al interactuar se pliegan, la componente entrópica será negativa para los tres, sin embargo, existe mucha diferencia entre los péptidos, por lo que parece que existen otros factores que influyen en $T\Delta S$. Por ejemplo, la diferencia entre estos péptidos radica en las regiones específicas con las que interactúan en la proteína. Tanto el W24N como el N36N interactúan con el bolsillo HP, de forma que esta interacción hidrofóbica contribuye a aumentar la entropía de unión, que resulta cercana a cero. Mientras que Y24L interactúa con el bolsillo NTP, de carácter polar. Como hemos descrito en el capítulo anterior, la interacción en este bolsillo implica una red de puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua interfacial, por lo que contribuye a incrementar la magnitud de la entalpía de unión favorable como de la entropía

desfavorable. No obstante, no se pueden descartar cambios conformacionales en la proteína asociados a las interacciones que contribuyan a modificar estos parámetros.

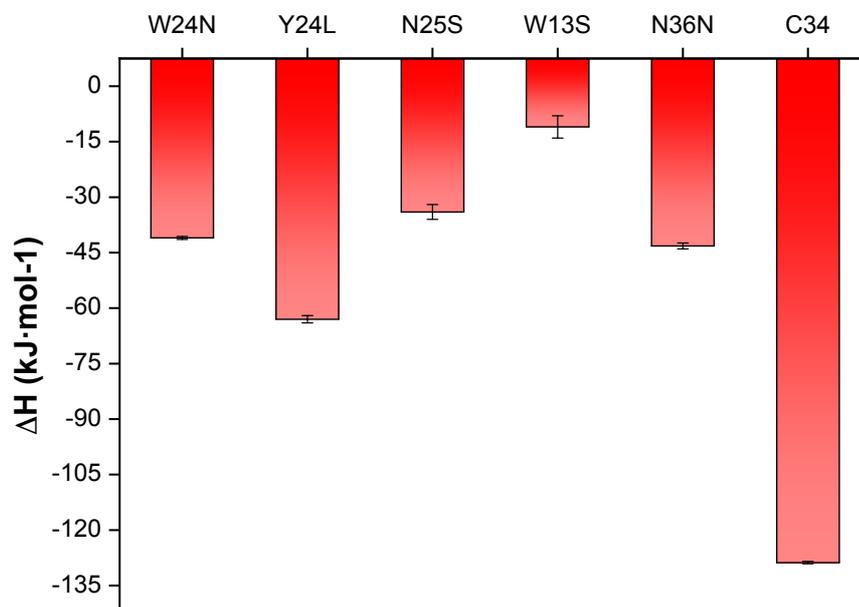


Figura 4.16. Comparación valores ΔH obtenidos en la interacción péptidos:proteína.

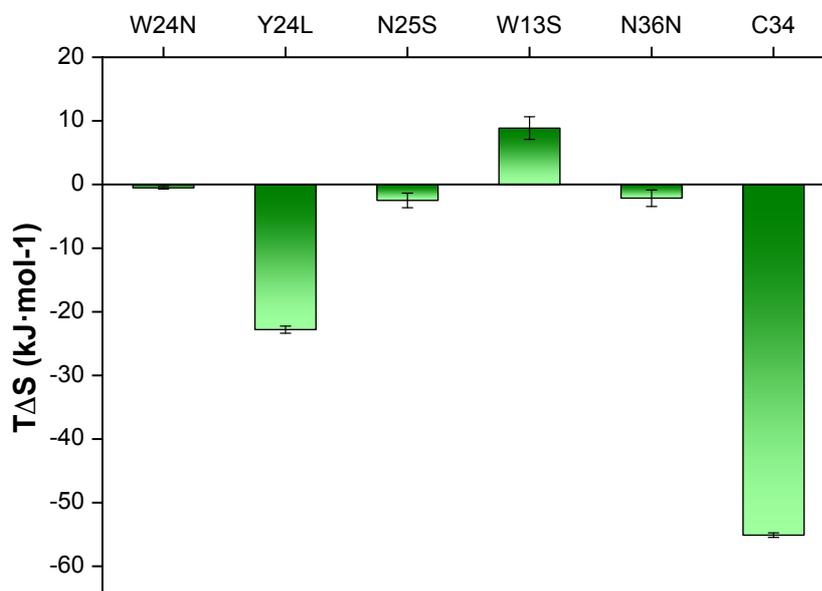


Figura 4.17. Comparación valores $T\Delta S$ obtenidos en la interacción péptidos:proteína.

4.3.5 Estudio de comunicación entre el bolsillo hidrofóbico y el bolsillo N-terminal

Los resultados anteriores sugieren una fuerte comunicación cooperativa entre los diferentes sitios de unión probablemente mediada por las interacciones de tipo “knobs-into-holes” (nudos en huecos) a lo largo de la estructura coiled-coil. Esto nos condujo a

preguntarnos cómo afectaría a la unión a otras regiones de la proteína como en el bolsillo hidrofóbico que el bolsillo N-terminal estuviera bloqueado, ya que podría existir un fenómeno de comunicación extendido a lo largo de toda la superficie de interacción de la proteína, entre puntos alejados (un cierto modo de alosterismo). Como ya se mostró en el capítulo anterior, la proteína covNHR-ER tiene dos mutaciones (V10E y Q123R) en la región del bolsillo polar NTP que modifican su estructura anulando su capacidad de unión a la región CHR. La interacción electrostática entre los grupos cargados de Glu 10 y Arg 123 podría provocar un cambio estructural que podría afectar a la forma de unión de los péptidos en los demás bolsillos, variando sus magnitudes termodinámicas de unión.

Para comprobarlo realizamos experimentos de ITC con covNHR-ER utilizando péptidos que se unen al bolsillo HP exclusivamente, W13S; y péptidos que se unen al bolsillo HP y otras regiones, como el bolsillo IP (W24N) o al bolsillo IP y la región C-terminal (N36N). Para el péptido W13S se realizaron experimentos de desplazamiento con C34. Mientras que con W24N y N36N se realizaron ensayos de ITC directos.

Como vemos en la tabla 4.3, los parámetros termodinámicos obtenidos en dicho estudio varían en comparación con la proteína covNHR-VQ.

Tabla 4.3. Parámetros termodinámicos de unión de los péptidos CHR con la proteína covNHR-ER

Péptidos	Kd (μM)	ΔH ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	N
W13S	290 ± 80	$-23 \pm 1,1$	1
W24N	$0,03 \pm 0,004$	$-55 \pm 0,2$	0.86
N36N	$0,05 \pm 0,01$	$-53,7 \pm 1$	1,23

En rojo se señalan los péptidos cuyos parámetros se obtuvieron por ITC de desplazamiento.

Si comparamos estos datos con los obtenidos con la proteína covNHR-VQ, vemos que para todos los péptidos existe una ligera disminución en la Kd y un aumento considerable en la entalpía de unión, compensado en parte por un incremento en la entropía de unión. Mucho más claro se ve en la figura 4.18.

El hecho de que los cambios en el perfil termodinámico de la unión provocados por las mutaciones en el bolsillo polar sean similares para los tres péptidos indica que dichos cambios se circunscriben fundamentalmente al bolsillo hidrofóbico.

Que la afinidad aumente y la entalpía sea más exotérmica indican una restructuración del bolsillo. La nueva superficie de contacto establece interacciones con un perfil más entálpico al amoldarse mejor a los péptidos, sin necesitar parte de la energía liberada en

la interacción para ello, aunque este efecto es parcialmente compensado por una mayor pérdida de entropía de unión, lo que indica una estructura más ordenada en el complejo.

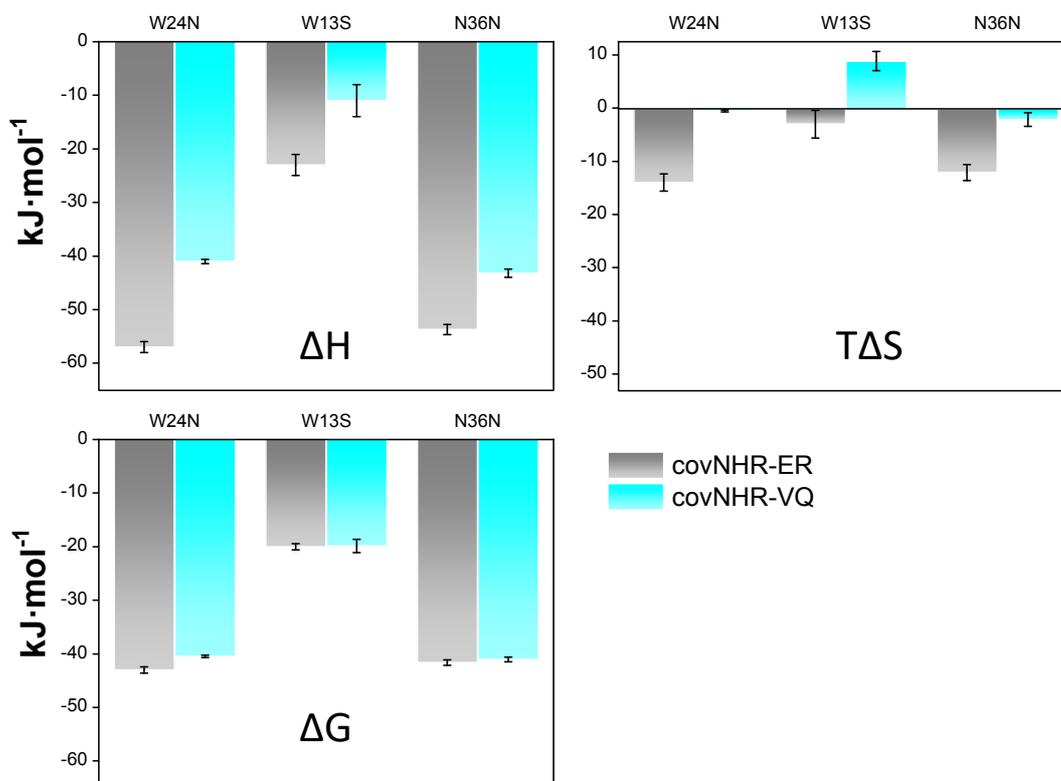


Figura 4.18. Diferencia de termodinámicas entre las interacciones de covNHR-VQ y covNHR-ER con los péptidos W24N, W13S y N36N.

Es decir, parece que la unión es más afín en estos péptidos cuando el bolsillo NTP se encuentra ocluido.

Por lo tanto, parece que existe una comunicación cooperativa entre las diferentes regiones de la proteína que abarca zonas distantes entre sí, como los bolsillos HP y NTP que distan unos 30 Å. Este hecho podría fundamentar un fenómeno de alosterismo entre los bolsillos más relevantes en la interfase de unión NHR-CHR, desde el punto de vista termodinámico.

4.4 Discusión

En la literatura actual, existe un vacío relacionado con la caracterización termodinámica de la interacción de las regiones NHR y CHR de la gp41. Este problema se debe a lo difícil que resulta trabajar con los trímeros de estas regiones, concretamente, en el caso del trímero de NHR debido a su inestabilidad y alta tendencia a la agregación^{68,96}.

Aún así, hay estudios que usan péptidos con las secuencias de aminoácidos de la región NHR, como el N36, y de la región CHR, como el C36 o C34¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Estos péptidos se caracterizan porque, en disolución, son capaces de formar la estructura de manojos de 6 hélices (6HB), gracias a lo cual tenemos información acerca de su estabilidad térmica y de la entalpía de desplegamiento de esta estructura post-fusión. Además, mutaciones producidas en estos péptidos revelan información sobre los aminoácidos implicados en la interacción, ya que una variación en dichos aminoácidos conlleva a una pérdida de estabilidad, es decir, un descenso en la temperatura de fusión. Por ejemplo, en el péptido N36, que tiene una numeración con respecto a gp160 que va del aminoácido 546-581, las mutaciones L568G o L568A provocan un descenso de la elipticidad molar del sistema cuando interacciona con el péptido C28, y un descenso de T_m de hasta 30°C¹⁰⁰. Lo mismo sucede con la mutación L565A, que disminuye la temperatura de fusión en 20°C¹⁰¹. Tanto la Leu 565 como la Leu 568 participan en las interacciones NHR-CHR del bolsillo hidrofóbico. Zheng y colaboradores¹⁰³, realizaron mutaciones en péptidos que mimetizan la región CHR, en posiciones *a* y *d* del coiled-coil en la región C-terminal de CHR. A partir de la S649, los aminoácidos en estas posiciones del coiled-coil son polares. Mutaciones que revierten la polaridad con aminoácidos hidrofóbicos en esas posiciones, como S649L o E659I aumentan la estabilidad térmica en la interacción NHR-CHR y la actividad antiviral de los péptidos C36. Esto va en consonancia con el principio del plegamiento de proteínas formando interacciones coiled-coil, según el cual las interacciones hidrofóbicas en posiciones *a* y *d* generan una energía libre de interacción mayor que las polares, ayudando a la estabilización de la estructura de las proteínas. Por otro lado, Wang y colaboradores, realizaron mutaciones en los aminoácidos hidrofóbicos de la primera zona de CHR, que están implicados en los motivos de unión al bolsillo hidrofóbico y al bolsillo intermedio, W628, W631, I635, I642, L645, sustituyéndolos por Ala. En todos los casos mencionados se produjo un descenso de la T_m al formar el coiled-coil entre péptidos C28 con estas mutaciones y N34, además de un descenso en la elipticidad del complejo, debido a una pérdida importante de interacciones con NHR, por

lo que estos aminoácidos tienen una mayor relevancia que los aminoácidos polares que nos encontramos en posiciones *a* y *d* a partir de la S649.

Sin embargo, estos estudios no proporcionan datos termodinámicos de la unión entre los péptidos y, mucho menos, de la disección entre las diferentes zonas de contacto, lo que otorga mucho más valor a este trabajo.

Al igual que la molécula 5-helix, la proteína covNHR-VQ ha demostrado ser un gran punto de partida para estudios de interacción NHR-CHR de este estilo, ya que en su superficie de contacto con la región CHR encontramos todos los determinantes de unión intactos, sin ninguna modificación. La estructura de la proteína covNHR-VQ en complejo con el péptido C34 mimetiza de forma prácticamente exacta la interacción NHR-CHR de gp41. Así pues, se presenta como una de las mejores moléculas diseñadas sobre las que probar diferentes compuestos que tengan o puedan tener capacidades inhibitorias, es decir, sería una gran molécula para realizar experimentos de cribado de alto rendimiento para identificar posibles inhibidores de fusión.

En este sentido, gracias a este estudio termodinámico, hemos observado que existen unos bolsillos de interacción mínimos necesarios en la región NHR para obtener afinidades suficientemente importantes para que determinadas moléculas sean consideradas útiles para el desarrollo de un fármaco inhibidor. Además, para el diseño de péptidos inhibidores es tremendamente importante tener en cuenta la relación entre afinidad y tamaño: cuanto más largo sea el péptido, mayor afinidad tendrá por la proteína, ya que abarcará un mayor número de regiones de contacto con la misma. Aunque si queremos conseguir una afinidad en el rango del pM, parece imprescindible que el péptido inhibidor abarque las regiones del bolsillo hidrofóbico, el bolsillo intermedio y el bolsillo polar N-terminal, como se ha descrito en el capítulo 3⁹⁷. Por el contrario, como ya se ha mostrado, un péptido corto (de 14 aminoácidos o menos), cuyo sitio de interacción no sea el bolsillo hidrofóbico, no va a ser capaz de interactuar con la proteína y su actividad va a ser nula; así como si nos centramos exclusivamente en un péptido que interactúe únicamente con el bolsillo hidrofóbico probablemente no obtendremos afinidades relevantes desde el punto de vista de fármaco inhibidor (tabla 4.2, péptido W13S).

Cabe destacar que no todos los estudios para la obtención de inhibidores de fusión se centran en el diseño de péptidos. Existen una notable cantidad de trabajos centrados en el estudio de moléculas pequeñas capaces de interactuar con el bolsillo hidrofóbico, como compuestos aromáticos e hidrofóbicos, eficaces en la interacción con los residuos hidrofóbicos que presenta la proteína en esa región¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Sin embargo, los resultados

obtenidos en la caracterización de la unión con los diferentes péptidos usando la proteína covNHR-VQ revelan que conseguir afinidades relevantes incluyendo solo el bolsillo hidrofóbico es altamente complicado, de manera que es necesaria la adición de interacciones con alguna región más, como puede ser la región intermedia (IR), para conseguir disminuir afinidades en el rango de nM.

Otra mención aparte necesita la región C-terminal de la proteína. Como vemos en los datos termodinámicos, no existe una gran influencia de esta zona en las afinidades y la entalpía de unión de W24N y N36N, que comparten la unión a HP e IP. Sin embargo, entre W13S y N25S sí existe una gran diferencia en la interacción, ya que la K_d de N25S es 100 menor que la de W13S, y la entalpía liberada es $23 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ superior. Según lo que suponíamos en la figura 4.1, la Asn 624 podría interactuar con el bolsillo C-terminal de la proteína. Sin embargo, diversos estudios revelan que en el motivo de unión ${}_{621}\text{QIWNNMT}_{627}$, la Met y la Thr forman una estructura con forma de ‘gancho’, llamado ‘MT-hook’, que permite mantener la capacidad de inhibición en un rango de nM bajo, aproximadamente 1-2 nM, de péptidos que contienen esta secuencia pero no tienen la región de unión al NTP^{108,109}. Sin embargo, la diferencia en los parámetros termodinámicos entre N25S y N36N pueden sugerir diferentes modos de unión o formación de este ‘MT-hook’. El modo de unión en esta región puede estar influido por la región intermedia, que es la zona donde interactúan los 11 aminoácidos de más que tiene N36N.

Que puedan existir diferentes modos de unión de una misma secuencia de un péptido en diferentes regiones de proteínas miméticas de NHR se ha descrito previamente. Yuxian He y colaboradores, en un trabajo muy reciente, han demostrado que la región rica en triptófanos del péptido T20, correspondiente con la parte inicial de la secuencia MPER de gp41, es capaz de interactuar con el bolsillo hidrofóbico¹¹⁰, al igual que demostramos en el capítulo anterior mediante los experimentos de ITC con los péptidos Y24L y T20 y la proteína covNHR-ER.

Durante la discusión, hemos estado centrándonos en las regiones importantes en la interacción NHR-CHR, esta interacción se lleva a cabo entre los residuos *e* y *g* de NHR y *a* y *d* de CHR. Sin embargo, Gellman y colaboradores realizaron un trabajo de caracterización termodinámica provocando cambios en aminoácidos en posiciones *a* y *d* y posiciones adyacentes que también pueden estar involucradas en la interacción, *e* y *g*, en el péptido mimético a CHR, T-2635, realizando esas sustituciones por alanina, observaron que existen variaciones en la temperatura a la que se produce la disociación

de los diferentes péptidos con la proteína modelo de la región NHR, gp41-5 (5-helix) ¹¹¹. Aparte de ver una reducción en la temperatura de disociación en aquellos péptidos que tienen mutados los residuos *a* y *d*, observan que existe también esa reducción al mutar los aminoácidos *e* y *g* que se están presentes en las secuencias que interaccionan con los bolsillos IP y NTP, con lo que esas posiciones adquieren relevancia a la hora del diseño de inhibidores peptídicos. Y al igual que demostramos con este estudio, Gellman y colaboradores apoyan la idea de que son necesarias un número determinado de interacciones mínimas para alcanzar afinidades entre NHR-CHR relevantes desde el punto de vista inhibitorio. Esta misma teoría es demostrada por Yuxian He y colaboradores¹⁰⁹ con diferentes versiones recortadas del péptido de CHR SC34EK-SC18EK. En este estudio los autores demostraron la importancia de residuos que se unen al bolsillo NTP, especialmente la Asn656 que, como vimos en el capítulo anterior, interacciona con una molécula de agua enterrada en el bolsillo NTP. Además, los autores proponen un papel regulador de la interacción de la Asn656 en este bolsillo sobre la estructura del “M-T hook”, es decir, un efecto alostérico a larga distancia, similar al mostrado en nuestro trabajo.

Esta conclusión se apoya sobre los últimos resultados del capítulo, en los que se muestra la interacción de los péptidos W13S, N36N y W24N con la proteína covNHR-ER, comparándolos con los datos de unión de dichos péptidos a la proteína covNHR-VQ. Los resultados muestran comunicación entre los bolsillos HP y NTP.

Sabemos que la proteína covNHR-ER tiene el bolsillo NTP ocluido, por lo que la morfología en dicha región también se encuentra distorsionada. Esta reestructuración en dicha zona de la proteína parece estar influyendo en el modo de unión de los péptidos. Ya que, la proteína covNHR-ER tiene más afinidad por el péptido W24N, y su entalpía es mayor, mientras que la unión de este péptido a la proteína covNHR-VQ genera menos entalpía. Esto podría ser debido a que parte de ese calor liberado es utilizado para reestructurar la superficie de la proteína de manera adecuada para la correcta unión del péptido. Esto mismo sucede con el péptido W13S, que se une sólo a la región del bolsillo hidrofóbico, pero en el caso de la proteína covNHR-ER con mayor ΔH , $-23 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ por los $-11 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ de la covNHR-VQ.

Al estar afectada la unión al bolsillo hidrofóbico usando el péptido W13S, cuando existe un cambio morfológico en el bolsillo polar N-terminal, sugiere que podemos encontrar un fenómeno de alosterismo, ya que, la modificación de una de las regiones de unión parece favorecer a la unión en el otro bolsillo de unión. Aunque para poder afirmar dicho

fenómeno se debería profundizar mucho más con estudios más dirigidos a comprobar la plasticidad de los bolsillos, que nos revelen la comunicación entre ambos.

Una buena técnica para ello sería la resonancia magnética nuclear (NMR). Esta técnica permite el estudio estructural de proteínas en disolución, así como de la variación estructural producida por la adición de ligandos en diferentes concentraciones. De esta manera se puede reconstruir con un nivel de resolución del residuo la transición entre la proteína en su estado libre y cuando está formando el complejo con sus diferentes ligandos, así como la variación estructural que sufre la proteína en una región alejada del punto de unión al ligando¹¹². Desafortunadamente estos estudios adicionales para comprobar la presencia de alosterismo en la región NHR se encuentran en una fase muy temprana y no existen datos suficientes que sirvan para aclarar esta hipótesis.

Desde el punto de vista biológico, la comunicación entre el bolsillo hidrofóbico y el bolsillo N-terminal se ha estudiado usando los péptidos C34 y T20^{113,114}. El péptido C34 tiene el motivo de unión al HP, al IP y al NTP, mientras que T20 puede interactuar con IP, NTP y además puede interactuar con la región próxima al péptido de fusión en la proximidad de la membrana lipídica gracias a su secuencia hidrofóbica correspondiente a la región MPER de gp41. El mecanismo de inhibición de estos péptidos es diferente, y por lo tanto se ven afectados de manera diferente por la aparición de mutaciones en NHR que confieren resistencia al virus. Como se ha descrito en el Capítulo anterior, con el T20, la aparición de cepas resistentes se lleva a cabo mediante mutaciones en la zona del bolsillo N-terminal, también llamada 'GIV motif', que correspondería a la G36 y la V38 en nuestra proteína. Que se lleven esas mutaciones de resistencia, sin embargo, no afecta a la capacidad de inhibición de los péptidos C34 y derivados, (que poseen la secuencia de unión al bolsillo hidrofóbico). Por el contrario, mutaciones de resistencia que se produzcan en el bolsillo hidrofóbico no afectarán a la inhibición por T20¹¹⁵. En el contexto de las interacciones entre NHR-CHR de la gp41 del virus, el que siga existiendo interacción entre estas regiones a pesar de que existan mutaciones de resistencia en NHR, indica una adaptabilidad de la interacción, es decir, la capacidad de infección del virus se mantiene a pesar de estar mutando en diferentes zonas para eliminar la acción de inhibidores peptídicos. Este trabajo apoya esta idea, ya que hemos observado que la capacidad de interacción de W24N, péptido que no interactúa con el NTP, e Y24L, péptido que no interactúa con el HP, se unen a la región NHR representada por el mimético covNHR-VQ con una gran afinidad, por lo que estos bolsillos no son esenciales en la interacción. Sin embargo, es el bolsillo intermedio el que rompe completamente las

interacciones de alta afinidad, ya que no incluir las secuencias de contactos con esta región en los péptidos inhibidores provoca un descenso drástico en la afinidad. Además, posibles mutaciones en esta zona NHR en la gp41 del virus podría generar estructuras ENV incapaces de llevar a cabo la infección.

4.5 Conclusiones

- Los bolsillos más prominentes que presenta la región NHR de gp41, el HP y el NTP, por sí solos no son dianas en las que centrarse de manera exclusiva si queremos diseñar péptidos inhibidores que tengan alta afinidad, ya que péptidos dirigidos a cada uno de ellos de forma aislada presenta nula o baja afinidad.
- La energía de la interacción NHR-CHR está ampliamente distribuida a lo largo de la interfase de unión y existe una fuerte cooperatividad entre las interacciones en diferentes bolsillos.
- Se necesitan de un número mínimo de regiones de interacción que abarquen al menos dos de estos bolsillos para obtener afinidades del rango nM.
- Los bolsillos HP y NTP pueden estar sometidos a un fenómeno de alosterismo que se transmite a través de la estructura del coiled-coil NHR, por el cual la modificación del bolsillo NTP generaría cambios conformacionales en el bolsillo HP favoreciendo la afinidad de la interacción.

Capítulo 5:

Diseño y producción de miniproteínas covNHR que ayuden a la comprensión del mecanismo de inhibición con gp41 como diana

5.1 INTRODUCCIÓN

Como se mencionó en la Introducción, el estado pre-fusión de gp41 está formado por 4 α -hélices, numeradas de 6-9, ya que sigue la nomenclatura de gp120 que acaba en la α -hélice 5. La α -hélice 6 engloba los aminoácidos Met 530 - Asn 543, la α -hélice 7 incluye los aminoácidos desde Gly 572 - Ile 595, forma un coiled-coil hidrofóbico con otras dos subunidades, que corresponde a la región C-terminal de la secuencia NHR. La α -hélice 8 contiene los aminoácidos Leu 619 - Trp 623, y por último la α -hélice 9, formada por los aminoácidos desde el Trp 628 hasta Asp 664, correspondiente a prácticamente toda la región CHR⁹¹. El péptido C34 abarca toda esta α -hélice, ya que está formado por Trp 628 - Leu 661. Las hélices α 6, α 8 y la primera parte de α 9 forman una especie de collar que rodea el extremo N y C-terminal de la proteína gp120. En esta interacción es muy importante un clúster hidrofóbico que implica las cadenas laterales de Met 530, y de los Trp 623, 628 y 631, figura 5.1. Recordemos que los Trp 628 y 631 están implicados en el motivo de unión al bolsillo hidrofóbico de nuestras proteínas. en cambio, los residuos de la segunda parte de la α -hélice 9 se encuentran con un mayor grado de exposición. Éstos son los implicados en la unión al bolsillo intermedio y al bolsillo N-terminal^{73,90,91}, figura 5.1.

Sin embargo, tanto covNHR-VQ como covNHR-ER, que como recordaremos no se une a Y24L, son capaces de producir inhibición de la infección, por lo que dicha región hidrofóbica debería de encontrarse parcialmente expuesta en algún momento de la infección.

Por otro lado, utilizando variantes de 5-helix con constantes de disociación por el péptido C37 (restos 625-661) que difieren en varios órdenes de magnitud, Root y sus colaboradores demostraron que la afinidad de unión entre cada variante de 5-helix por su diana no se correlaciona con la capacidad inhibitoria de cada molécula⁷⁶. Aunque la afinidad por C37 se incrementa en algunas variantes hasta alcanzarse valores de Kd inferiores a pM, los correspondientes valores de IC₅₀, es decir, la concentración de proteína a la que se reduce la infección por el virus a la mitad, alcanzan un límite en varios órdenes de magnitud superior, en torno a nM. Algunas versiones de 5-helix cuya Kd tienen un orden de magnitud de nM presentan una IC₅₀ en ese mismo rango de concentraciones.

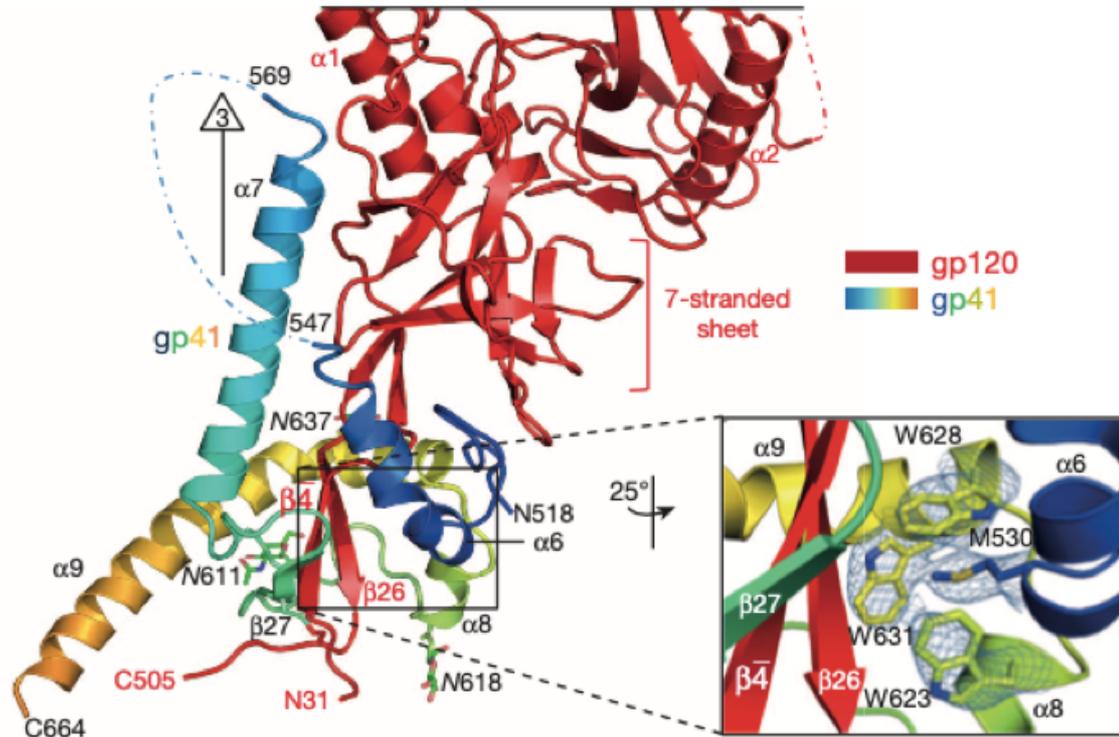


Figura 5.1. Estructura de uno de los monómeros de gp41. En rojo se muestra parte de la región de gp120 que interacciona con gp41. En la ampliación observamos el collar hidrofóbico que rodea la región gp120. Figura adaptada de Pancera et al. 2014

De estos hechos, dedujeron que existe un factor cinético que limita la interacción entre 5-helix y la región CHR de gp41 del virus. Esto puede deberse a un limitado grado de exposición de algunos de los determinantes de unión en CHR que, como se describe más arriba, se encuentran ocluidos al estar implicados en interacciones en la Env nativa. Por esta razón, la región CHR debe exponerse transitoriamente para ser accesible por 5-helix. No obstante, impedimentos estéricos derivados del tamaño relativamente grande de la molécula 5-helix también podrían estar jugando un papel¹¹⁶.

Un resultado similar lo hemos encontrado también en nuestro estudio descrito en el capítulo 3⁹⁷. La proteína covNHR-VQ tiene una Kd con respecto al péptido C34 de aproximadamente 0,08 pM, mientras que la proteína covNHR-ER tiene una Kd de 15 nM. Existe una diferencia de 5 órdenes de magnitud. Por el contrario, las IC₅₀ de ambas proteínas sólo difieren en 2-5 veces dependiendo del virus. Es decir, al igual que la proteína 5-helix, un incremento en la afinidad de la proteína por la región CHR no resulta en un aumento similar en la actividad de inhibición, sino que ésta está limitada cinéticamente por impedimentos estéricos que podrían estar asociados al tamaño de la proteína.

Probablemente, debido al alto grado de glicosilación que sufre el complejo gp120/gp41, como podemos observar en la figura 5.2³⁷, los glúcidos que recubren las dos proteínas que forma la ENV actúan como un escudo que impide el fácil acceso a las moléculas dirigidas frente a determinantes estructurales de gp120 y gp41. Macromoléculas como los anticuerpos también sufren este impedimento estérico.

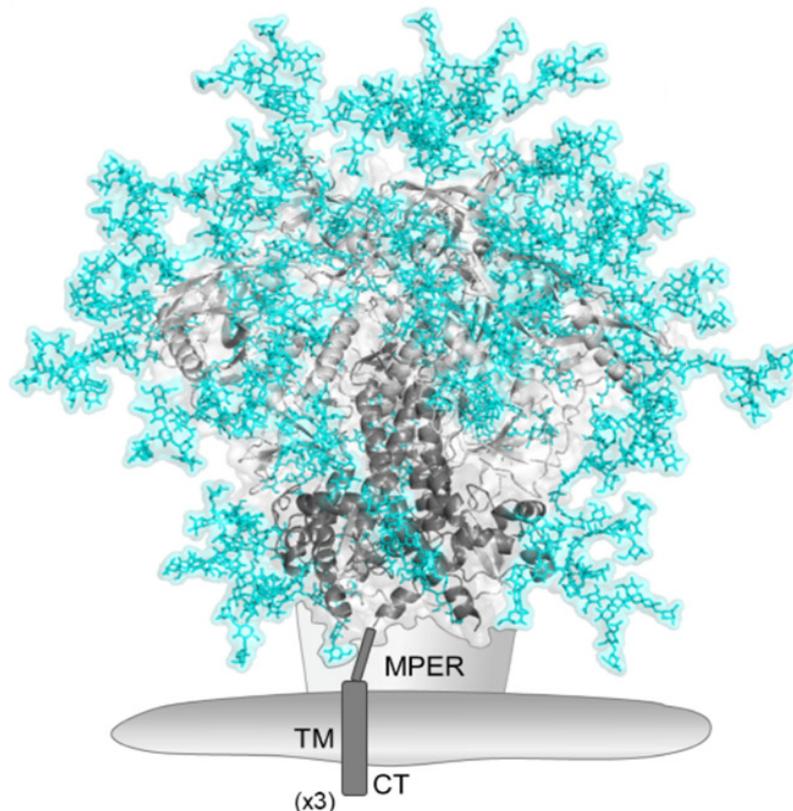


Figura 5.2. Representación del complejo ENV del virus VIH-1. En gris se muestra el complejo formado por gp120 y gp41, en cian se muestra las glicosilaciones que presenta el complejo. Imagen adaptada⁷.

Por otra parte, los resultados descritos en los capítulos anteriores indican que es posible alcanzar una afinidad por la región CHR en el rango nM con sólo dos de los 4 bolsillos de unión definidos en NHR. Además, existe una incertidumbre acerca del papel que juega cada uno de estos bolsillos de unión en la capacidad de inhibición de las proteínas covNHR. Por ejemplo, aunque la máxima inhibición se alcanza con covNHR-VQ, la variante covNHR-ER, que tiene anulado el bolsillo NTP, muestra una actividad muy próxima.

Sobre la base de estos datos, nos planteamos la posibilidad de diseñar versiones de las proteínas covNHR con un tamaño molecular reducido, que incluyeran sólo dos de los

cuatro bolsillos de la región NHR: Por un lado, una proteína que abarque el bolsillo polar N-terminal (NTP) y el bolsillo intermedio (IR), cuya secuencia diana en CHR sería la región C-terminal de la α -hélice 9 en la estructura pre-fusión de gp41. Esta región parece ser más accesible en la Env nativa antes incluso a que se desencadenen los eventos de fusión y presenta ya una estructura en hélice. De esta forma, será posible observar si con esta miniproteína existe una mejora en la capacidad inhibitoria de las proteínas.

Por otro lado, una proteína que abarque los determinantes de unión del bolsillo hidrofóbico (HP) y el bolsillo C-terminal (CT). Aunque su secuencia diana en la región N-terminal de CHR esté oculta y no estructurada en α -hélice, esta proteína nos permitiría comprobar la capacidad de estos bolsillos para unirse a su diana e inhibir la fusión en ausencia de los otros dos bolsillos y, además, diseccionar mejor los datos termodinámicos obtenidos por ITC en el capítulo anterior.

También se persiguió el diseño de una variante reducida que presentara el bolsillo HP y el bolsillo IP, aunque desafortunadamente no se consiguió su expresión.

Con esta idea surgen las proteínas covREC-HP y covREC-NTP. CovREC-HP presenta los sitios de unión del bolsillo hidrofóbico y la cavidad C-terminal. Mientras que covREC-NTP tiene el bolsillo N-terminal y el bolsillo intermedio. Como podemos observar en la figura 5.2, las proteínas son variantes recortadas prácticamente a la mitad del tamaño de covNHR-VQ, de ahí su nombre, REC (recortada), aunque comparten una pequeña región próxima al bolsillo hidrofóbico.

Las diferencias entre ambas moléculas permiten a una mejor comprensión de los mecanismos de fusión del virus, y abren un nuevo campo en el diseño de inhibidores de fusión proteicos más pequeños, pero que tengan mayor estabilidad y propiedades farmacocinéticas que los péptidos inhibidores como el T20.

5.2 Objetivos

- Diseño, producción y purificación de las variantes reducidas de covNHR-VQ.
- Caracterización biofísica de las proteínas covREC, mediante CD y DLS.
- Caracterización de los parámetros termodinámicos de unión de ambas proteínas a sus dianas peptídicas mediante ITC.
- Estudios de función: experimentos de unión a virus y ensayos de inhibición de la infección.

5.3 Resultados

5.3.1 Diseño, producción y purificación

Como ya hemos mencionado, como punto de partida utilizamos la secuencia y la estructura de covNHR-VQ en complejo con C34⁹⁷ (PDB: 62RG). La estrategia de diseño se ilustra en la figura 5.2. El diseño de cada miniproteína se realizó siguiendo los principios de diseño enumerados en el capítulo 2 de Materiales y Métodos. Ambas proteínas tienen un tamaño similar, 11,9 kDa para covREC-NTP, y 12,9 kDa para covREC-HP. Las secuencias de ADN codificante para ambas proteínas fueron sintetizadas y clonadas en los vectores de expresión pET303 CT-Histag, diseñados para la producción en *E.coli*.

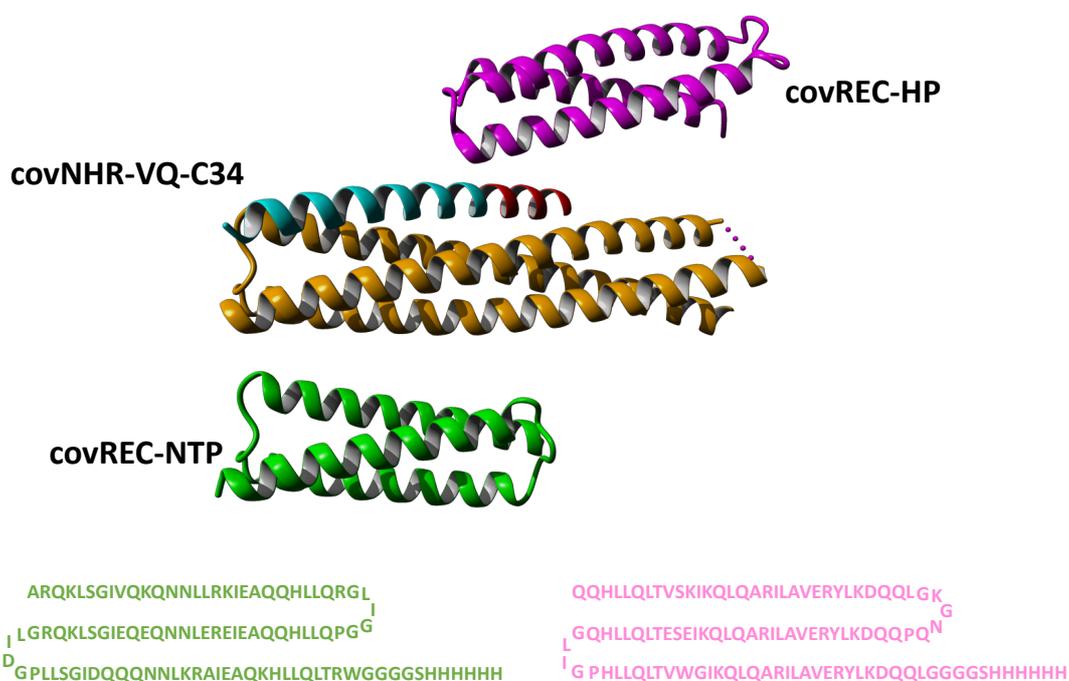


Figura 5.2. Representación de los modelos de estructura de las proteínas covREC procedentes de la división de covNHR-VQ. En verde se muestran la secuencia y la proteína covREC-NTP, en rosa se muestran la secuencia y la proteína covREC-HP.

Una vez recibimos los plásmidos, realizamos las pruebas de expresión para comprobar si las proteínas podían ser expresadas por las bacterias y encontrar las mejores condiciones de expresión. Ambas proteínas presentan sobreexpresión y en ambos casos la mejor condición de expresión es mediante la inducción con 0,5 mM de IPTG, e incubación durante toda la noche a 27°C. Como podemos observar en la figura 5.3, ambas proteínas

se detectan en SDS-PAGE con una banda aproximadamente en la misma posición debido a su tamaño similar.

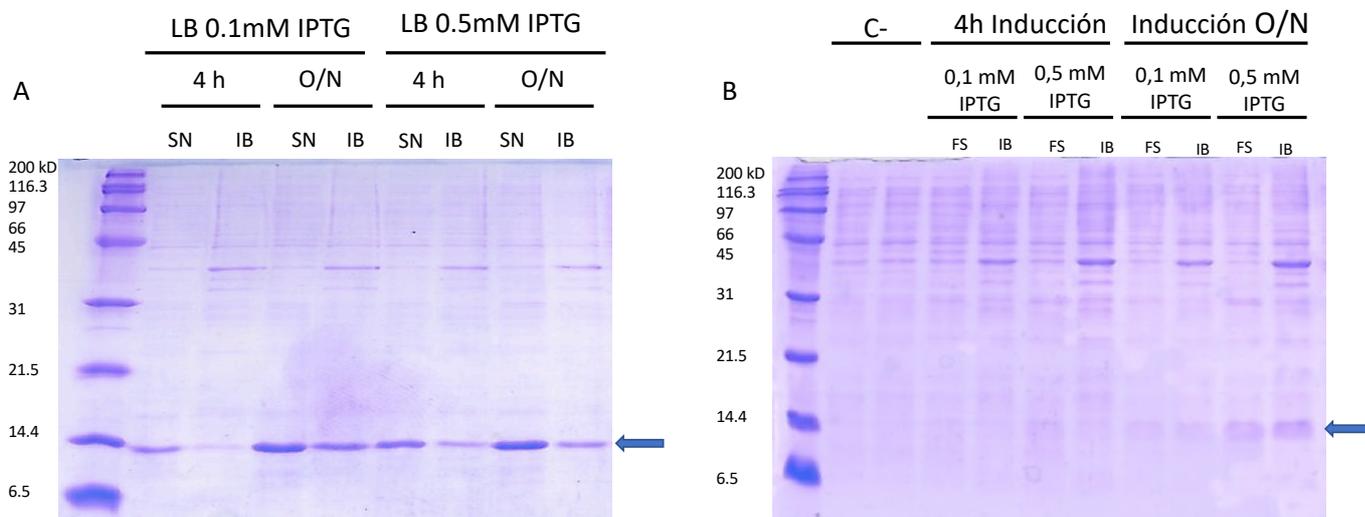


Figura 5.3 Geles PAGE-SDS de las pruebas de expresión de las proteínas. Panel A) prueba de expresión covREC-NTP. Panel B) prueba de expresión covREC-HP.

Una vez que seleccionamos la mejor condición de expresión para ambas proteínas, se llevó a cabo una producción a mayor escala, seguida de su purificación.

Las dos proteínas se purificaron con un rendimiento y pureza suficiente para llevar a cabo su caracterización tanto biofísica como funcional. La proteína covREC-NTP presenta un rendimiento de 20 mg/L de cultivo, mientras que covREC-HP tiene un rendimiento menor de 3 mg/L de cultivo.

5.3.2 Caracterización biofísica

5.3.2.1 Caracterización estructural por CD

Del estudio de las moléculas anteriores, covNHR-ER y covNHR-VQ, sabemos que presentan un mejor comportamiento biofísico a pH 2,5, ya que a temperaturas superiores a 90°C no precipitan y poseen una desnaturalización parcialmente reversible, además pueden soportar el proceso de congelación/descongelación sin alteración de su estructura. Por eso el tampón elegido para almacenar estas proteínas congeladas es Glycina/HCl 50 mM pH 2,5. Sin embargo, todos los experimentos de caracterización tanto termodinámica como funcional se realizan a pH 7,4. Por lo que se decidió empezar la caracterización de covREC-HP y covREC-NTP en estos dos pH.

Para ello, se registraron espectros de Far-UV a 20°C de ambas proteínas en ambas condiciones, figura 5.4. De los espectros se calculó el porcentaje de α -hélice. CovREC-NTP tiene un 64% de α -hélice a pH 7,4. Mientras que a pH ácido, como pH 2,5, se encuentra parcialmente desplegada, y posee una estructura en α -hélice menor del 30%. Por el contrario, la proteína covREC-HP presenta unos valores de α -hélice muy similares, alrededor de 70 %, en ambas condiciones, por lo que es mucho más estable en un rango mayor de pH.

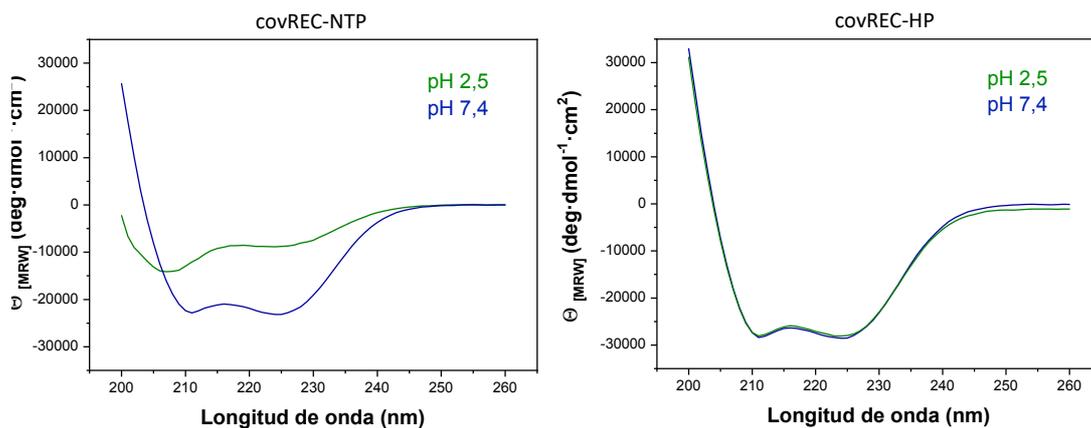


Figura 5.4. Espectros de dicroísmo circular Far-UV de covREC-NTP y covREC-HP en dos condiciones de pH.

Además, medimos la estabilidad térmica de las proteínas mediante CD. Para ello, fijamos una longitud de onda a 222 nm, y registramos la variación en elipticidad entre 10 y 98°C mediante el control de temperatura del espectropolarímetro. Para comparar ambas proteínas, el experimento se realizó a pH 7,4. Además se registraron los espectros de FAR-UV a 10°C, 98°C y de nuevo a 10°C para comprobar si existe replegamiento, figura 5.5.

Como podemos observar, la proteína covREC-HP tiene una estabilidad térmica muy elevada, ya que no se observa ninguna transición que nos permita discernir la temperatura de fusión de la proteína, por lo que su T_m es superior a 98°C, aunque tiene una pérdida de elipticidad paulatina. En contraste, covREC-NTP es mucho menos estable y presenta una pérdida de elipticidad brusca en torno a 40°C, correspondiente a su desplegamiento térmico.

Si nos fijamos en la diferencia entre los espectros a 10°C con los espectros realizados a 10°C una vez finalizada la desnaturalización, podemos comprobar una reversibilidad parcial del desplegamiento.

De todos estos datos podemos concluir que la proteína covREC-NTP es mucho menos estable que covREC-HP, tanto en temperatura como en rango de pH. Por ello, pasamos a caracterizarla en condiciones adicionales de pH, para comprobar donde se encuentra el punto óptimo tanto de estabilidad térmica como de estructura. En estos experimentos usamos 3 condiciones adicionales de pH (en tampones acetato 50 mM pH 4 y pH 5, y cacodilato 50 mM pH 6); y aumentamos la fuerza iónica a pH 7,4, usando fosfato sódico 50 mM con NaCl 100 y 200 mM.

Para estas condiciones se realizaron los experimentos de desnaturalización térmica, con los que calculamos la T_m y el porcentaje de α -hélice.

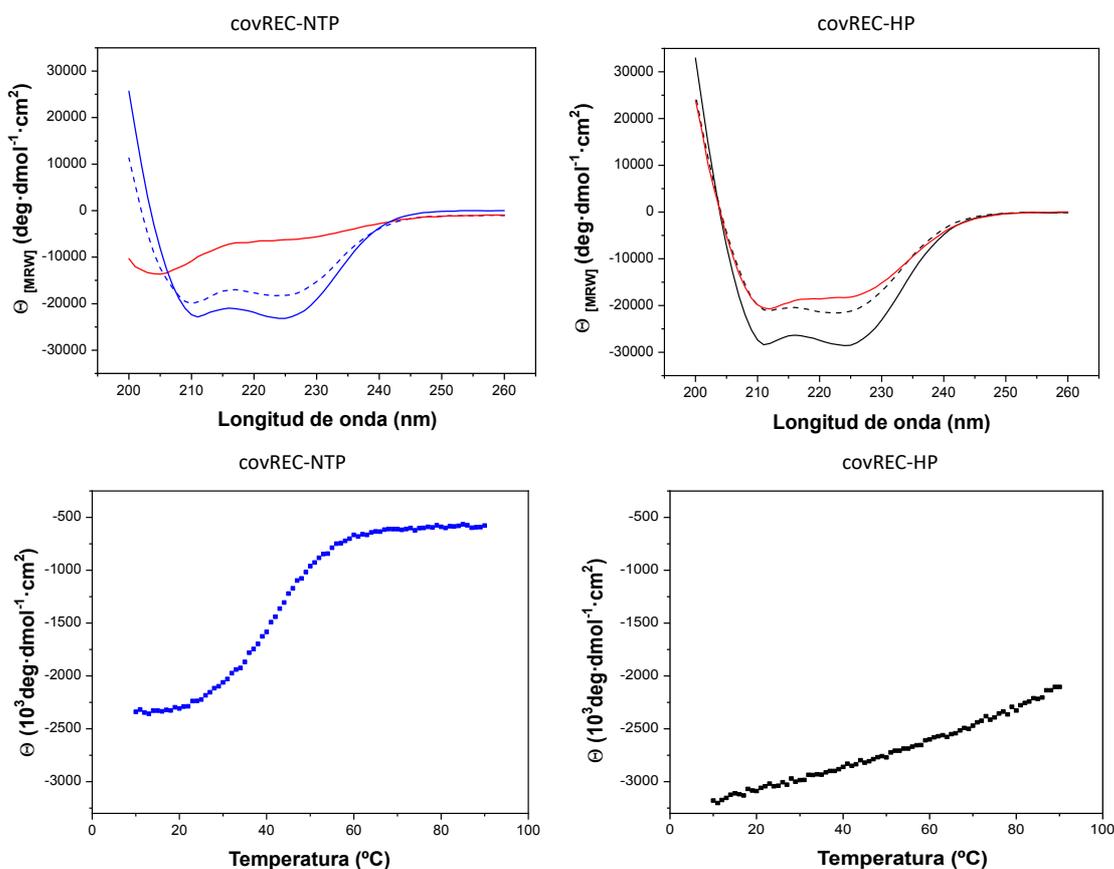


Figura 5.5. Espectros de CD a 10 y 98 °C y desnaturalización térmica de covREC-NTP (azul) y covREC-HP (negro). En discontinuo se muestran los espectros tras el repliegamiento de las proteínas. En rojo se muestran los espectros obtenidos a 98°C.

Como podemos observar en la figura 5.6, a medida que desciende el pH la proteína covREC-NTP pierde estructura, por lo que parece claro que la proteína es más estable a pH 7,4. Si nos fijamos en los datos obtenidos variando la fuerza iónica en el tampón, no observamos grandes diferencias, aunque que sí parece claro que el aumento de fuerza iónica provoca una ligera disminución en estructura en α -hélice y de estabilidad térmica.

Los valores obtenidos de T_m y los porcentajes de α -hélice (calculados según Luo y Bladwin, 1997⁷⁰) para cada condición se encuentran recogidos en la tabla 5.1.

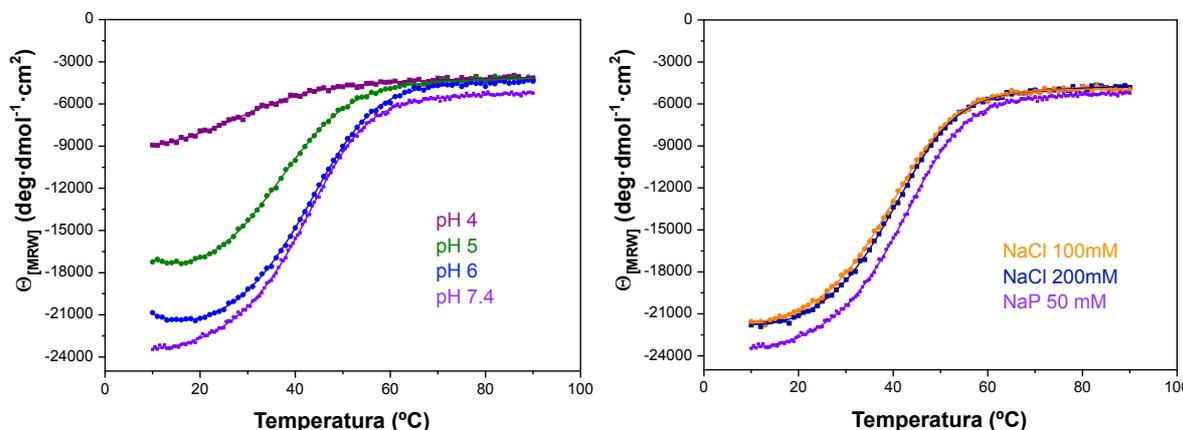


Figura 5.6. Desnaturalización térmica de covREC-NTP observada por CD. A la izquierda se muestra la dependencia del pH, a derecha la dependencia de la fuerza iónica. Las líneas que atraviesan los puntos son los ajustes al un modelo de desplegamiento de dos estados, descrito en ANEXOS.

5.3.2.2 Caracterización de tamaño molecular y agregación mediante DLS

Al igual que con la caracterización por CD, ambas proteínas fueron caracterizadas mediante DLS en las condiciones antes mencionadas para estudiar su tamaño molecular, así como la tendencia a la agregación que pueden tener dependiendo del pH y la fuerza iónica.

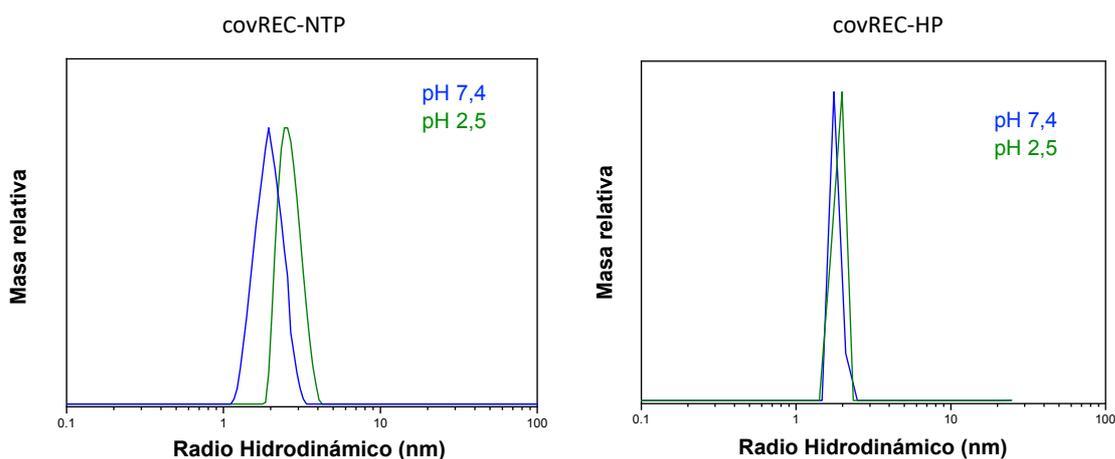


Figura 5.7. Medidas de DLS de las proteínas covREC en condiciones de pH 2,5 y 7,4.

Comparando pH 2,5 y pH 7,4, las medidas de DLS de covREC-NTP muestran un aumento del tamaño molecular a pH 2,5. El radio hidrodinámico pasa de 1.9 nm a 3 nm, debido, posiblemente, al desplegamiento parcial que sufre la proteína y que se observa

por CD, fig 5.4. Sin embargo, covREC-HP no presenta cambios significativos de radio hidrodinámico, entre 1,8-1,9 nm para ambas condiciones de pH, figura 5.7.

Continuando con la caracterización de covREC-NTP en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica, vemos que, hasta un pH de 5, la proteína se comporta de manera monomérica aunque su estructura se ve resentida ya a pH 6. A pH 4 se observa el aumento de radio hidrodinámico que observamos a pH 2,5. En este caso, el aumento de fuerza iónica no afecta al tamaño molecular de la proteína, figura 5.8.

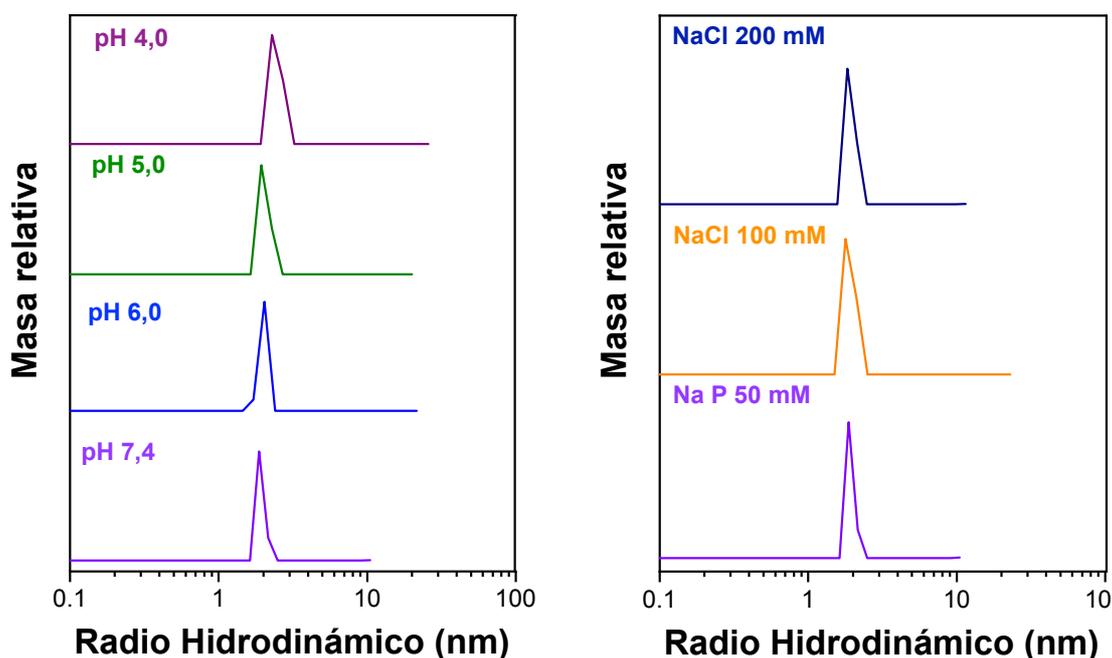


Figura 5.8. Experimentos de DLS de covREC-NTP a diferente pH y fuerza iónica.

Los datos biofísicos obtenidos de las caracterización de ambas proteínas quedan recogidos en la tabla 5.1. Si observamos los valores de entalpía de desplegamiento (ΔH_{un}) y temperatura de fusión (T_m), la proteína covREC-NTP es más estable a pH 6,0. Sin embargo, si observamos el porcentaje de α -hélice, la proteína se encuentra con un mayor grado de estructura a pH 7,4. Esto es un dato favorable ya que la unión a péptidos CHR se realiza a pH 7,4 en tampón NaPi. En cuanto a la proteína covREC-HP, presenta mucho mayor estabilidad, tanto a pH ácido, 2,5; como a pH neutro, 7,4.

Tabla 5.1. Resumen de los parámetros de estructura, tamaño y estabilidad de las proteínas covRECs

Proteínas	pH/[NaCl]	% α -hélice ¹	Tm (°C) ²	ΔH_{un}^2 (kJ·mol ⁻¹)	Rh (nm)
covREC-NTP	2,5	< 20	-	-	3
	4	26	30 ± 2	83 ± 4	2,4
	5	48	38 ± 0,1	116 ± 1,5	1,9
	6	58	43 ± 0,1	120 ± 1,4	1,9
	7,4	64	41 ± 0,2	110 ± 2,5	1,9
	7,4 100 mM NaCl	60	37,6 ± 1,3	100 ± 11	1,8
	7,4 200 mM NaCl	60	38 ± 0,6	95,8 ± 4	1,9
covREC-HP	2,5	71	>90	-	1,9
	7,4	72	>90	-	1,9

¹ Valores obtenidos con el valor de elipticidad a 222 nm⁷⁰

² Datos obtenidos mediante ajuste según el modelo de desplegamiento de dos estados explicado en ANEXOS

Por lo tanto, de la caracterización biofísica de estas nuevas moléculas podemos decir que de estructuran en una conformación en α -hélice con un porcentaje similar al esperado teóricamente, si bien covREC-NTP parece un poco más desestructurada. Ambas tienen un tamaño molecular esperado. Y covREC-HP presenta una mayor estabilidad térmica con una Tm > 98°C, mientras que covREC-NTP tiene una estabilidad térmica mu baja con una Tm de 41°C.

5.3.3 Caracterización termodinámica de unión covRECs y péptidos CHR

Debido a su diseño, de cada una de las proteínas presenta diferentes regiones de interacción con su diana CHR con respecto a covNHR-VQ. Por tanto, los péptidos de la región CHR utilizados para caracterizar la posible unión fueron N25S e Y24L. A modo de recordatorio, el péptido N25S interacciona en el bolsillo hidrofóbico y el bolsillo C-terminal, mientras que el péptido Y24L interaccionan con el bolsillo intermedio y el bolsillo polar N-terminal, como podemos observar en la figura 5.9. El péptido N25S será la diana de covREC-HP y el péptido Y24L será la diana de covREC-NTP.

Como en capítulos anteriores, primero estudiamos la unión de manera cualitativa por dicroísmo circular, tanto en Far-UV como en Near-UV y posteriormente se procedió al estudio termodinámico por ITC.

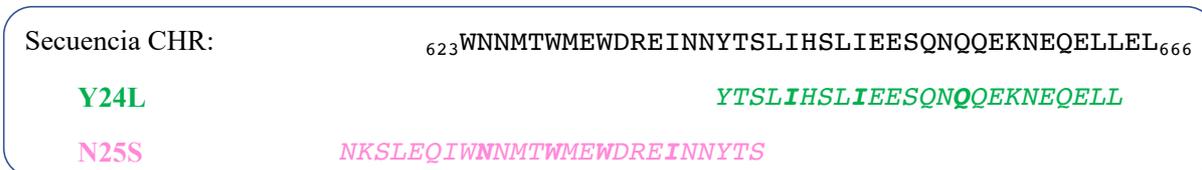


Figura 5.9. Secuencias de los péptidos utilizados en el estudio de interacción con covRECs.

5.3.3.1 Experimentos de unión por dicroísmo circular

Las medidas de CD se registraron a una concentración de 10-20 μM de proteína y una concentración de péptido para alcanzar una ratio de 1:2. Como podemos observar en la figura 5.10, ambos complejos presentan un aumento de elipticidad negativa mayor que la suma teórica de elipticidades de la proteína y el péptido separados, aunque en el complejo covREC-HP – N25S es solo ligeramente superior a la suma teórica.

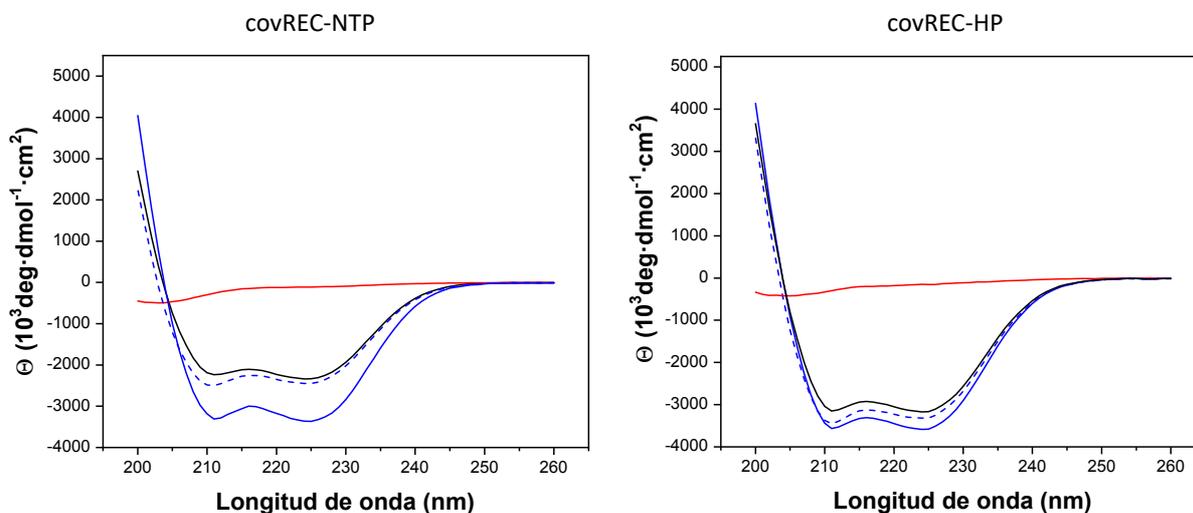


Figura 5.10. Espectros de CD en Far-UV de las proteínas y los complejos con los péptidos correspondientes. En negro se representa la proteína libre, en azul el complejo, en discontinuo la suma teórica proteína+péptido y en rojo el espectro del péptido.

Estos datos nos indican que existe unión entre N25S y covREC-HP, e Y24L y covREC-NTP. Además, esa unión se puede confirmar, en el caso de la proteína covREC-HP, por NEAR-UV, ya que esta proteína posee el bolsillo hidrofóbico, y la interacción producida por N25S en esa cavidad dará lugar a la señal 293nm ya observada para las proteínas covNHR-ER y covNHR-VQ con diferentes péptidos, como hemos visto en capítulos

anteriores. Como se observa en la figura 5.11, existe esa señal al medir el complejo en comparación con la proteína libre.

La señal es menos intensa que la obtenida para covNHR-VQ con ese mismo péptido, pero con la misma forma y en la misma longitud de onda, por lo que podemos confirmar que existe unión entre el N25S y la proteína, y que esa unión se produce en el bolsillo hidrofóbico.

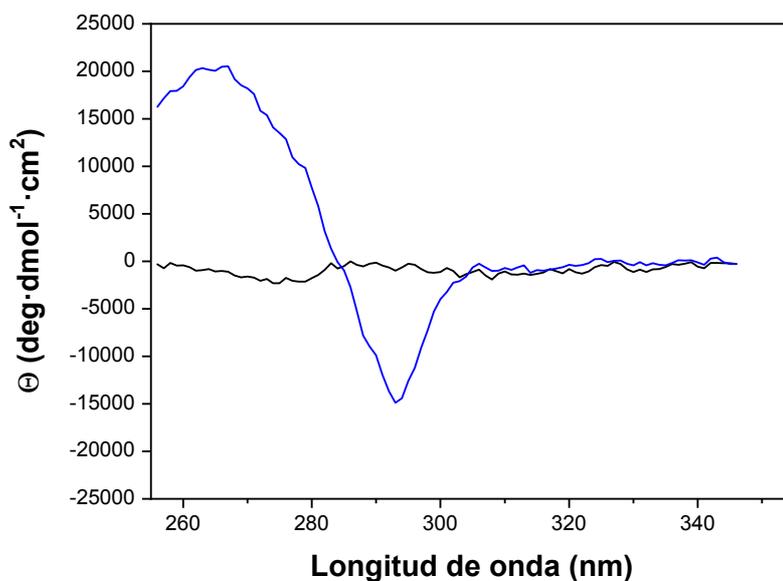


Figura 5.11. Espectros de CD en Near-UV de la proteína covREC-HP (negro), del complejo formado entre ésta y el péptido N25S (azul).

Debido a la baja estabilidad de la proteína covREC-NTP, pudimos comprobar como afecta la unión del péptido a su desplegamiento térmico. Como podemos observar en la figura 5.12, la elipticidad negativa a baja temperatura aumenta al aumentar la concentración de péptido, y además vemos como la T_m de la transición se desplaza de 41°C a 46°C, por lo que podemos deducir que la unión del péptido provoca un aumento de la estructura de α -hélice y una estabilización térmica. Además, la pendiente de la transición aumenta, lo que indica un aumento de la entalpía de la desnaturalización del complejo, como consecuencia de la interacción.

Además, usando los diferentes ratios de concentración proteína:péptido se han podido simular las curvas de desplegamiento de esos complejos mediante un modelo de desplegamiento de dos estados acoplado a la unión de ligando, modelo que se describe en ANEXOS. Para estas simulaciones hemos tenido en cuenta los parámetros termodinámicos de la unión, calculados mediante ITC, como se describe más adelante.

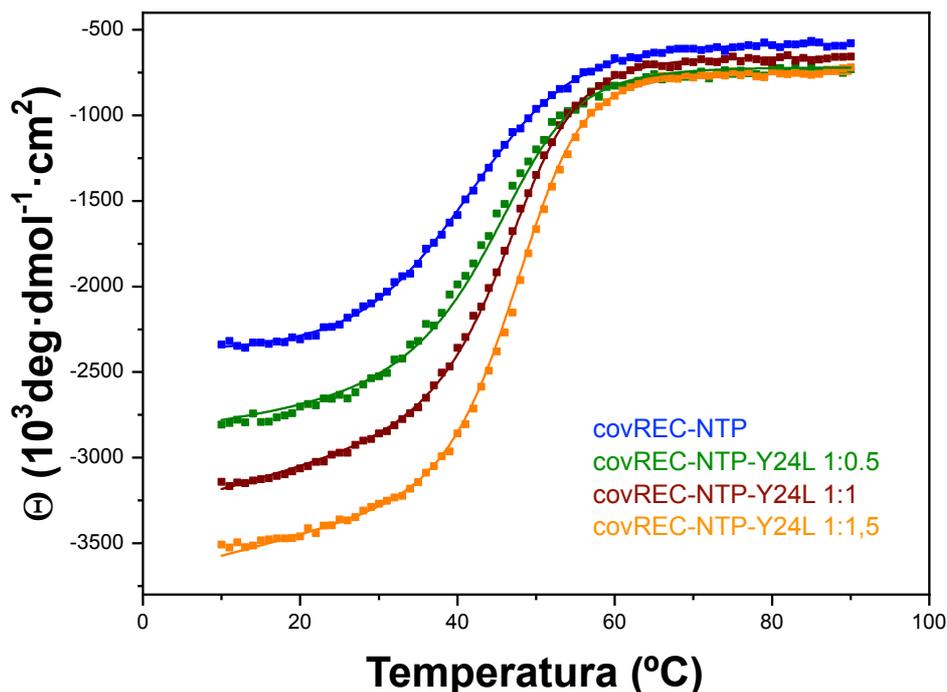


Figura 5.12. Desnaturalización térmica de la proteína covREC-NTP libre y en complejo con Y24L de 10-90°C, por CD. En puntos se representan los datos experimentales, el ajuste a un modelo de desplegamiento de dos estados acoplado a unión de ligando se representa con líneas.

5.3.3.2 Caracterización termodinámica de la unión por ITC

Una vez comprobado que existe unión entre cada proteína y sus respectivos péptidos diana, pasamos a la caracterización termodinámica de esas interacciones mediante calorimetría isotérmica de titulación.

La figura 5.13 muestra las titulaciones directas de covREC-NTP y covREC-HP con el péptido Y24L y N25S, respectivamente.

Los parámetros termodinámicos de la interacción, obtenidos mediante un modelo de unión con n sitios idénticos e independientes, quedan recogidos en la tabla 5.2.

Si realizamos los cálculos para obtener la energía de Gibbs y la entropía de unión nos encontramos que la interacción covREC-NTP – Y24L presenta una energía de Gibbs similar a covREC-HP – N25S. Sin embargo, la entalpía de unión es casi del doble en magnitud y, por lo tanto, la disminución de entropía de la interacción es mucho mayor para covREC-NTP – Y24L, como podemos ver en la figura 5.14. Esta diferencia se puede atribuir a que el complejo covREC-NTP-Y24L sufre una mayor estructuración al formarse. Una de las causas puede ser la estabilización de la proteína al formarse el complejo, ya que la proteína covREC-NTP es muy poco estable, como se observa en los resultados de desnaturalización térmica.

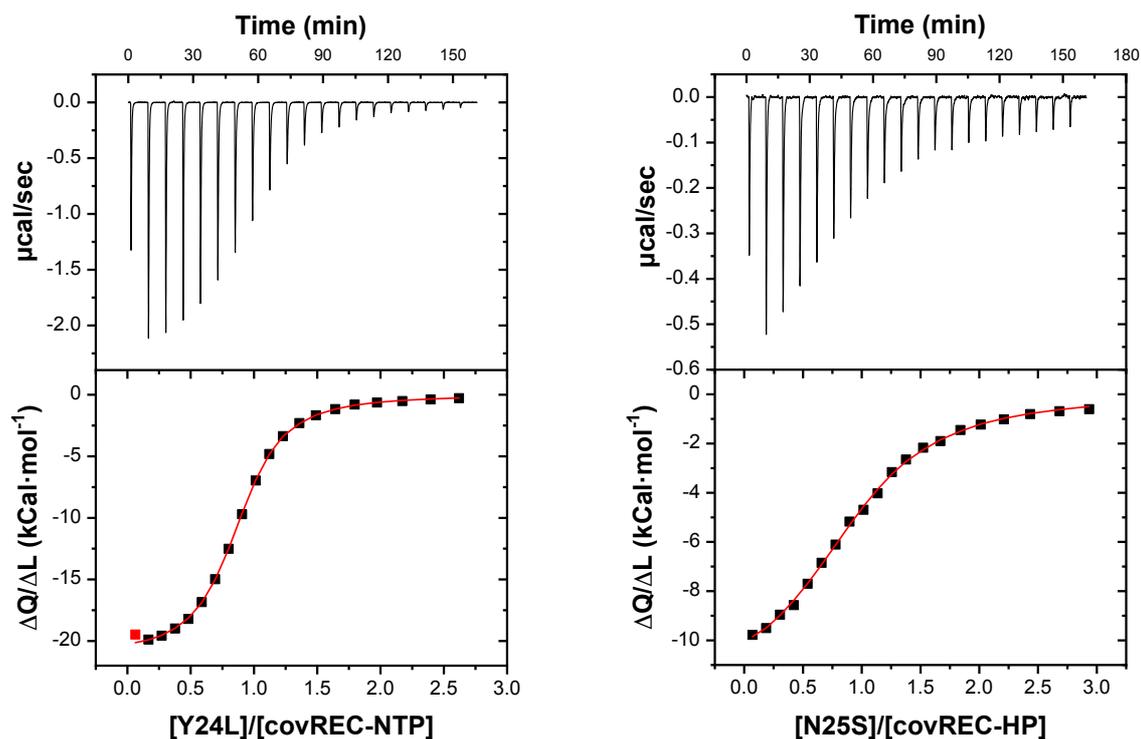


Figura 5.13. Experimentos de ITC directos entre proteína y péptido realizados a 25°C. La línea en rojo muestra el ajuste del experimento al modelo de unión a n sitios idénticos e independientes.

Por el contrario, la interacción entre covREC-HP – N25S libera menos entalpía y tiene un efecto entrópico menor, debido a que la interacción no necesita estabilizar la estructura de la proteína, ya que, como hemos visto, covREC-HP es mucho más estable que covREC-NTP.

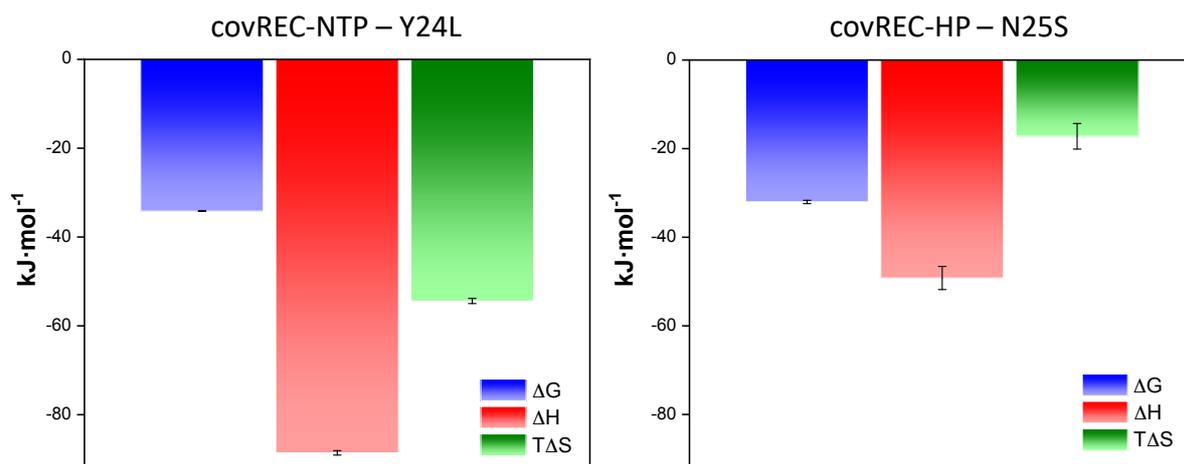


Figura 5.14. Huella termodinámica de la interacción entre las proteínas covREC y sus respectivos péptidos diana de la región CHR a 25 °C.

Seguidamente, se prosiguió con el cálculo de la capacidad calorífica de unión (ΔC_p) de ambas proteínas, variando la temperatura en un rango de 10-25°C, debido a la baja estabilidad térmica de covREC-NTP. La figura 5.15 muestra la variación de entalpía de

unión con la temperatura. En la interacción de covREC-NTP – Y24L se observa un ΔC_p de $-2,87 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, mientras que el ΔC_p de la interacción covREC-HP – N25S es de $-1,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

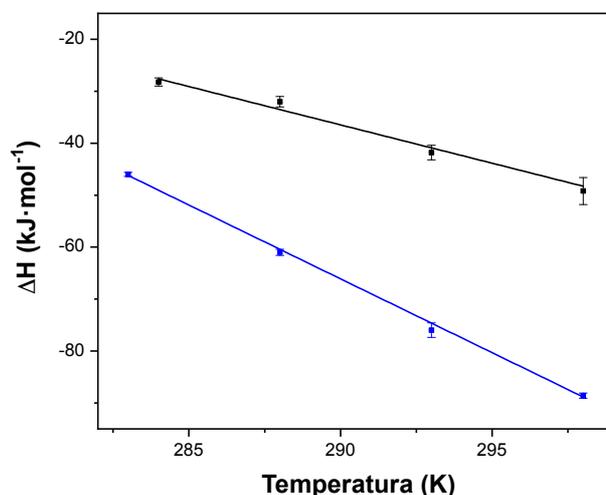


Figura 5.15. Cálculo de ΔC_p de unión de las proteínas covREC-NTP (azul), y covREC-HP (negro), con sus respectivos péptidos.

Esta gran diferencia parece ser debida a la fuerte estructuración y estabilización que sufre covREC-NTP al interactuar con el péptido Y24L, como vimos de los experimentos de CD a diferente ratio molar, y se observa en los experimentos de RMN ^1H - ^{15}N -HSQC de la proteína marcada con N^{15} , libre y en complejo, figura 5.16.

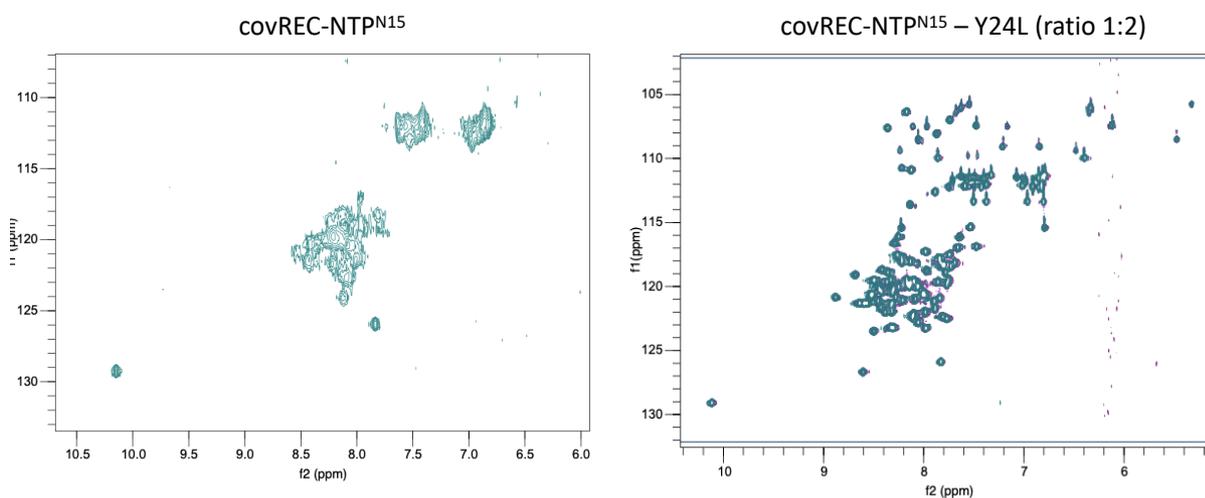


Figura 5.16. Espectros RMN ^1H - ^{15}N -HSQC de la proteína covREC-NTP libre y en complejo con Y24L, disueltas en NaPi 50mM pH 7,4 10% D2O, 0,02% azida a 30°C .

En estos espectros se ve como las señales de covREC-NTP libre (a una concentración de $400 \mu\text{M}$) están mal definidas. Existe un ensanchamiento de línea considerable y una baja dispersión que puede deberse a la baja estabilidad y a una tendencia a la agregación a las

altas concentraciones de RMN. Al añadir el péptido Y24L a una concentración saturante (ratio 1:2) se produce una rigidificación que permite una mejor definición de las señales, aumentando la dispersión de desplazamientos químicos.

En contraste, el ΔC_p de unión de N25S a covREC-HP es idéntico al encontrado para covNHR-VQ (Capítulo 3), lo que sugiere un modo de unión similar del péptido a ambas proteínas.

Tabla 5.2. Parámetros termodinámicos de las interacciones covREC-NTP – Y24L y covREC-HP – N25S obtenidos por ITC.

Complejo	Temperatura (°C)	Kd (μ M)	ΔH ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	n	ΔC_p b ($\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
covREC-NTP – Y24L	10	0,23 \pm 0,02	-46 \pm 0,4	0,86	-2.8 \pm 0,2
	15	0,29 \pm 0,02	-61 \pm 0,6	0,84	
	20	0,44 \pm 0,02	-76 \pm 1,4	0,8	
	25	0,79 \pm 0,02	-88,6 \pm 0,5	0,91	
covREC-HP – N25S	10	0,24 \pm 0,4	-28 \pm 0,8	0,84	-1,5 \pm 0,2
	15	0,31 \pm 0,06	-32 \pm 1	0,8	
	20	0,48 \pm 0,09	-41,8 \pm 1,4	1,03	
	25	1,9 \pm 0,3	-49,2 \pm 2,6	0,94	

Los errores en los parámetros corresponden a unos intervalos de confianza del 95 %

Una vez finalizada la caracterización de la interacción de las proteínas con sus correspondientes péptidos derivados de la secuencia diana en CHR, se pasó al estudio funcional de las proteínas, que incluyó la caracterización de la unión a ENVs nativas solubilizadas, y al estudio de la actividad inhibitoria de ambas proteínas.

5.3.4 Caracterización funcional de covRECs

5.3.4.1 Ensayos de unión a ENVs estabilizadas

Al igual que en los estudios de unión realizados con las proteínas covNHR-ER y covNHR-VQ, se llevaron a cabo ensayos ELISA directos de unión entre las proteínas covREC-NTP y covREC-HP con 5 variantes diferentes de estructuras solubles

estabilizadas de ENV, formadas por gp120 y gp41, cuyas características se mencionaron en el capítulo 3. En estos experimentos se fijaban las diferentes ENVs en una placa ELISA de 96 pocillos, se añadían las proteínas a una concentración de 0,1 µg/mL, que se detectaban mediante un anticuerpo conjugado con peroxidasa que reconocía la extensión de Histidinas.

En la figura 5.17 se muestran los resultados normalizados por porcentaje de unión relativo a un control positivo que consiste en una proteína Env con cola de histidinas.

Como se observa claramente, covREC-NTP es capaz de unirse a todas las ENVs probadas. Cabe destacar, que estos experimentos se realizaron a 25°C, debido a la baja estabilidad térmica de covREC-NTP. No obstante, como se observa en los resultados de ITC, la proteína es capaz de interactuar con Y24L, por lo que es perfectamente funcional lo que queda demostrado con estos experimentos de unión.

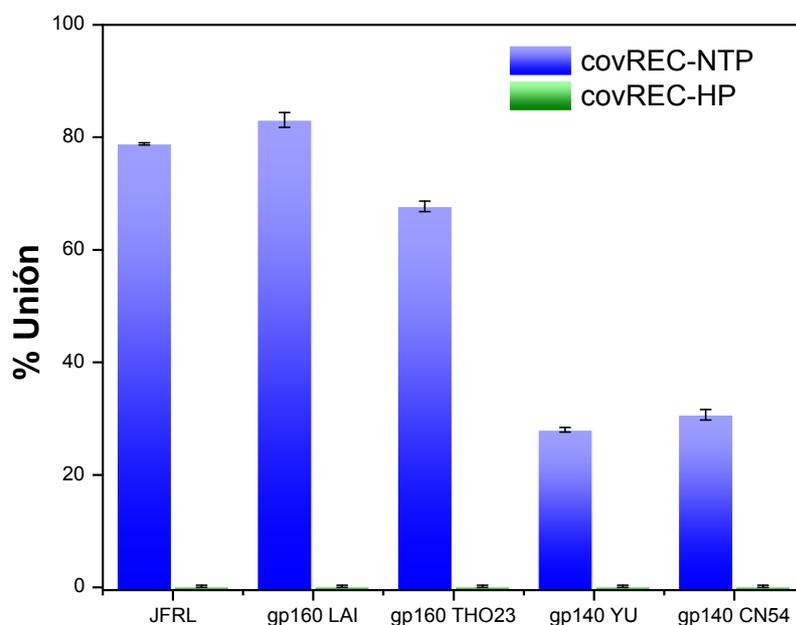


Figura 5.17. Resultados de los ensayos ELISA de unión de las proteínas covREC a las diferentes estructuras solubles estabilizadas de ENV, experimento realizado a 25°C.

En contraste, covREC-HP no se une a ninguna de las proteínas ENV ensayadas, posiblemente porque su secuencia diana en la región N-terminal de CHR no es accesible en la conformación nativa pre-fusión de las ENV.

Con estos resultados, se decidió probar la capacidad inhibidora de ambas proteínas de la infección por VIH-1 en ensayos in vitro, ya que durante la fusión es posible que los determinantes de unión de covREC-HP a gp41 sean expuestos de manera transitoria.

5.3.4.2 Experimentos de inhibición con covRECs con diferentes cepas de VIH-1

Los ensayos de inhibición TZM-bl se realizaron con 2 cepas diferentes de pseudovirus de VIH-1, recogidas dentro de una clasificación del grupo de Montefiori⁷⁴, SF162 y MW956.26, además de dos pseudovirus diseñados para la resistencia a T20, pNL4.3 y pNL4.3 DIM. Estos experimentos se realizaron a 37°C, ya que para que se produzca la fusión e infección entre virus y células es necesaria una temperatura fisiológica. Debido a la baja estabilidad térmica de covREC-NTP ($T_m \sim 40^\circ\text{C}$), la concentración efectiva de la proteína se verá muy probablemente afectada, ya que parte de las moléculas estarán desplegadas. Sin embargo, como vemos en la figura 5.18, la proteína covREC-NTP presenta actividad inhibitoria frente a la cepa pNL 4.3 DIM (resistente a T20), con una IC_{50} de 280 nM, una concentración menor que para T20, aunque alta para ser considerada reseñable para un inhibidor proteico.

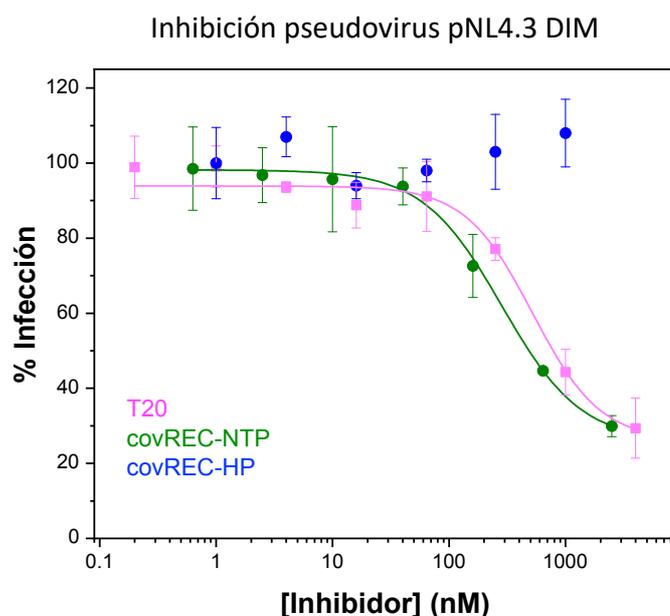


Figura 5.18. Ensayo de inhibición TZM-bl con el pseudovirus pNL4.3 DIM (resistente a T20). Con puntos se muestran los valores de % de infección a cada concentración de inhibidor por duplicado, con líneas se representa el ajuste sigmoideal a la ecuación de Hill.

Por el contrario, covREC-HP no presenta actividad inhibitoria para ninguna cepa probada, como se puede observar en la figura y en la tabla 5.3.

Sin embargo, para las cepas SF162 y MW 956.26, la actividad de inhibición del péptido T20 es mucho mayor que la de nuestros constructos. En el caso de la cepa SF162, difícil de neutralizar, ninguna de las dos proteínas muestra capacidad inhibitoria. Para la cepa MW956.26, de fácil neutralización, covREC-HP no presenta inhibición, mientras que covREC-NTP tiene una actividad casi 200 veces menor que T20.

Tabla 5.3. Actividad inhibidora (valores IC₅₀ en nM) de las proteínas covREC comparadas con T20 en ensayos de inhibición TZM-bl frente a diferentes pseudovirus

Pseudovirus	covREC-NTP	covREC-HP	T20
<i>PNL 4.3 XCS</i>	740 ± 100	**	182 ± 25
<i>PNL 4.3 DIM</i>	280 ± 15	**	494 ± 256
<i>SF162</i>	**	**	51 ± 1
<i>MW 956.26</i>	740 ± 260	**	4 ± 1

Los datos se obtuvieron por ajuste sigmoidal de la ecuación de Hill. Los errores se obtienen del ajuste a un intervalo de confianza del 95%.

5.4 Discusión

5.4.1 Estructura, tamaño molecular y estabilidad térmica

Gracias a los experimentos de CD, hemos podido comprobar cual es el porcentaje de α -hélice que presentan estas nuevas proteínas miméticas a NHR. covREC-NTP presenta un 64% de estructura en α -hélice, mientras que covREC-HP tiene un 72%, comparando ambas a pH 7,4. A pH 2,5 la proteína covREC-NTP se encuentra parcialmente desplegada, mientras que covREC-HP tiene el mismo porcentaje en α -hélice que a pH fisiológico. El porcentaje de estructura en α -hélice en los modelos de diseño de ambas proteínas, teniendo en cuenta los lazos de conexión entre las hélices y las colas de histidinas, es el 76%, lo que indica que covREC-HP tiene un nivel de estructura similar al del modelo, mientras que covREC-NTP está menos estructurada, lo que está de acuerdo con su baja estabilidad conformacional.

Las proteínas presentan un radio hidrodinámico muy similar a pH 7,4, 1,8-1,9 nm, es decir, que la diferencia de 1 kDa no es suficiente para generar diferencias mayores en radio hidrodinámico. Este tamaño es un 50% menor que el obtenido para covNHR-VQ, 2,7 nm, aunque se haya reducido su tamaño casi a la mitad. De nuevo la extensión de His desplegada toma una relevancia elevada a la hora de calcular el tamaño, pudiendo representar un alto porcentaje del tamaño final de la proteína, ya que se sabe que una misma proteína tiene un radio hidrodinámico superior cuando se encuentra en estado desnaturalizado que al estar plegada¹¹⁷. Como se muestra en los datos a pH 4 en la proteína covREC-NTP, al estar parcialmente desplegada tiene un radio superior, de 2,2 nm.

Por otro lado, si comparamos la estabilidad térmica de ambas proteínas observamos como covREC-HP tiene una alta estabilidad, $T_m > 98^\circ\text{C}$ tanto a pH 7,4 como a pH 2,5. Sin embargo, covREC-NTP tiene una temperatura de fusión en la condición más estable, pH 7,4, de 41°C , por lo que su estabilidad térmica es mucho menor que tanto covREC-HP como covNHR-VQ ($T_m > 100^\circ\text{C}$ a pH 7,4). Esto parece indicar que estabilidad de la mitad C-terminal del trímero de helices NHR es mucho mayor que la de la región N-terminal. Esto se observa también en la estabilidad de la estructura a pH ácido, ya que covREC-NTP es más propensa a desplegarse y a aumentar su radio hidrodinámico al someterla a condiciones de pH ácido. Como ya se mencionó en la introducción de este

capítulo, esa región C-terminal de la secuencia de NHR se encuentra estructurada y formando un coiled-coil hidrofóbico, hélice $\alpha 7$ de la estructura de gp41 pre-fusión. Mientras que la secuencia N-terminal se encuentra desordenada, lo que podría explicar ese comportamiento diferente, dividiendo la región NHR en dos subdominios, uno correspondiente a covREC-NTP (subdominio menos estable en N-terminal), y el otro correspondiente a covREC-HP (subdominio de mayor estabilidad en el extremo C-terminal de NHR)⁹¹

5.4.2 Capacidad de unión a regiones miméticas de CHR

Como hemos visto en los resultados, la proteína covREC-NTP tiene una afinidad por su secuencia diana, Y24L, algo mayor que covREC-HP por la suya, N25S. Con unas constantes de disociación de 0,8 μM y 2 μM respectivamente a 25°C, la temperatura más alta ensayada. Teniendo en cuenta que covREC-NTP no tiene en su estructura la región de unión correspondiente al bolsillo hidrofóbico, confirmamos de nuevo que esta cavidad hidrofóbica no es imprescindible para que se lleven a cabo interacciones NHR-CHR de alta afinidad, como se demostró en el capítulo 4.

Si comparamos los parámetros termodinámicos de la interacción entre proteínas recortadas y sus péptidos, con los de la proteína covNHR-VQ y esos mismos péptidos, vemos diferencias apreciables. Primero vemos que la afinidad de covNHR-VQ por Y24L, y por tanto su energía libre, es mayor que la obtenida por la interacción entre covREC-NTP e Y24L, aproximadamente un orden de magnitud superior. Sin embargo, la entalpía que se libera de esta interacción es superior en la proteína recortada que en covNHR-VQ. El ΔC_p de unión de covREC-NTP e Y24L es también mucho más negativo, si lo comparamos con el producido por la interacción covNHR-VQ – Y24L, -2,8 por -1,6 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Estas diferencias pueden explicarse por la fuerte estructuración que sufre la proteína acoplada a la unión del péptido, como demuestran también los experimentos de RMN. El aumento de entalpía tan considerable es fuertemente compensado por una gran disminución entrópica debida a la estructuración, lo que repercute en la disminución de afinidad observada, como se observa en la figura 5.19.

Por el contrario, la afinidad de la interacción entre covREC-HP y covNHR-VQ por N25S es bastante parecida, a 25°C las K_d son de 1,9 y 3 μM , respectivamente, lo cual se ve reflejado en valores de ΔG prácticamente iguales. Sin embargo, la entalpía de unión es superior en la interacción del péptido con covREC-HP, lo que repercute en un

componente entrópico más negativo. Las razones de esta diferencia no están claras, ya no existe un problema de estabilidad en covREC-HP y los valores de ΔC_p de unión son iguales, lo que sugiere una estructura similar de la interfase de unión. Es posible que la proteína covREC-HP tenga una flexibilidad conformacional acentuada, comparada con el subdominio homólogo en covNHR-VQ, debido a la reducción de tamaño que implica un acortamiento de la estructura coiled-coil. La unión del péptido implicaría por tanto una cierta estructuración con los consiguientes aumentos del término entálpico y entrópico de la unión. No obstante, no ha sido posible registrar los espectros de RMN de la proteína libre y el complejo en este caso debido a la baja solubilidad de covREC-HP.

Entonces, parece claro que la entalpía liberada en el proceso de unión sufre una alta compensación entrópica para ambas proteínas, por lo que podría existir un proceso de ordenamiento y estructuración de ambas variantes recortadas, en comparación con covNHR-VQ, más demostrable en el caso de covREC-NTP que en covREC-HP, ya que los valores de ΔC_p de unión de covREC-HP y covNHR-VQ son los iguales.

De hecho, la disminución de entropía es mucho más reseñable en covREC-NTP–Y24L, con un valor de ΔS de aproximadamente $-57 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, mientras que en covREC-HP-N25S es de $-18 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, unas tres veces menos en magnitud. Esto que indica una mayor estructuración del complejo covREC-NTP–Y24L en el proceso de unión, posiblemente derivada de la poca estabilidad conformacional en su forma libre.

Si comprobamos únicamente la afinidad de las proteínas por su péptido diana, encontramos valores similares a los obtenidos por IQN17 para péptidos cortos o cíclicos dirigidos al bolsillo hidrofóbico^{80,81}, cuyas afinidades se encuentran en un rango micromolar, al igual que covREC-HP y N25S.

Tras la caracterización que realizamos de la unión de las diferentes regiones de CHR a la proteína covNHR-VQ descrita en el capítulo anterior, junto con los datos termodinámicos obtenidos en este capítulo, parece claro que la región del bolsillo polar N-terminal junto a la región del bolsillo intermedio pueden ser suficientes para que un inhibidor mimético de NHR alcance una afinidad suficiente por la región complementaria de CHR. Sin embargo, una molécula que incluya únicamente el bolsillo hidrofóbico, sin la presencia al menos de la región intermedia no presentará afinidades superiores a un rango micromolar.

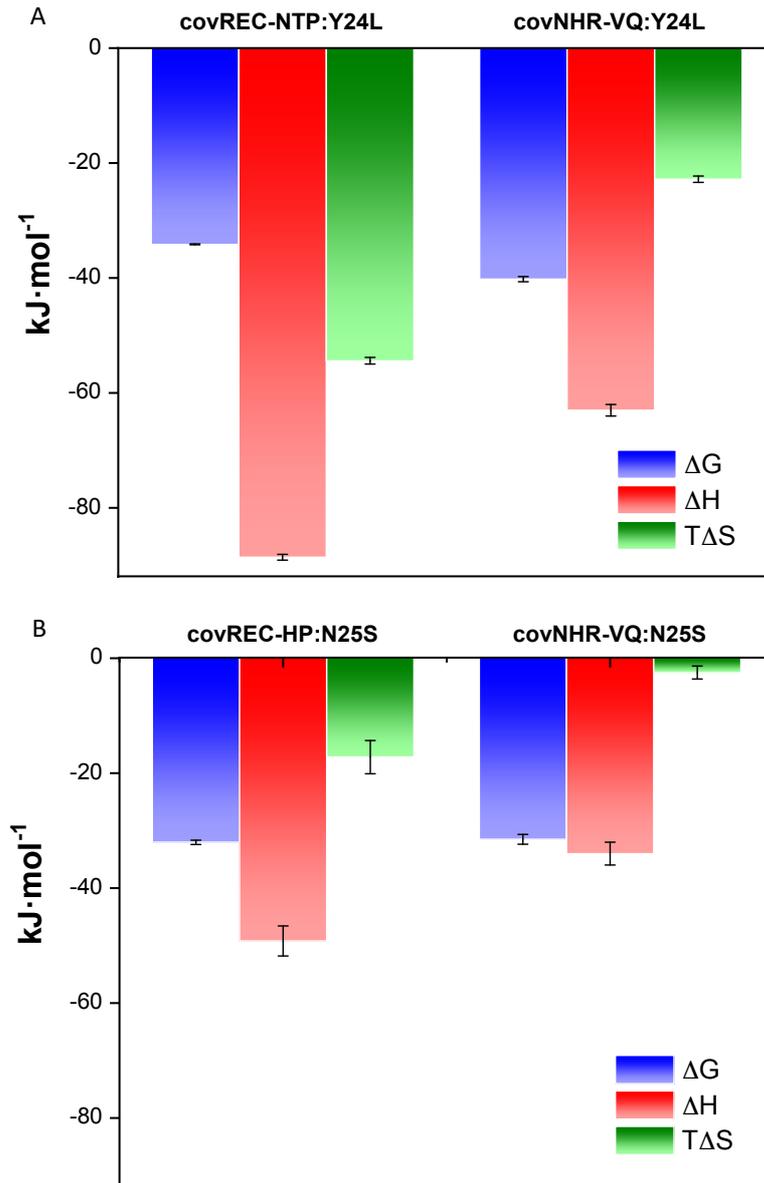


Figura 5.19. Comparación de los perfiles termodinámicos de las interacciones covNHR-VQ – Y24L, panel A, y covREC-HP – N25S, panel B.

5.4.3 Capacidad de unión a ENV nativas

Los resultados obtenidos muestran unión a las estructuras ENV nativas por parte de covREC-NTP, mientras que covREC-HP no es capaz de interactuar con ninguna de las ENV probadas. La imposibilidad de unión de covREC-HP es fácilmente explicable puesto que la secuencia de aminoácidos de CHR en gp41 que interactúa con ella, es decir los Trp del motivo de unión el bolsillo hidrofóbico, están ocluidos en la región donde se inserta gp120^{90,91}, impidiendo la accesibilidad de covREC-HP. A pesar de ello,

en el capítulo 3 vimos como covNHR-ER, que contiene los mismos determinantes de unión que covREC-HP, añadiendo además el bolsillo intermedio, sí puede interactuar con las mismas ENV. Volviendo a remarcar que esta región parece fundamental a la hora de encontrar interacción entre las proteínas y la región CHR de gp41.

Por el contrario, covREC-NTP tiene una capacidad de unión a las distintas ENV similar a covNHR-ER, aunque menor que covNHR-VQ. Que su región diana esté preformada y parcialmente accesible, como vimos en la introducción⁹¹, correspondiente a región C-terminal de la hélice $\alpha 9$ de gp41, parece que ayuda a que se observe interacción. Sin embargo, la fuerte pérdida de afinidad de covREC-NTP por Y24L parece que puede influir en el descenso de unión al compararla a covNHR-VQ. En este caso, la reducción en el tamaño, aunque podría beneficiar a la unión ante la reducción de impedimentos estéricos, no compensa la reducción de afinidad por la diana y por tanto no se traduce en un incremento de interacción con las estructuras ENV nativas.

5.4.4 CovREC como inhibidor de la infección por VIH-1

Al igual que en estudios anteriores^{61,97}, las nuevas proteínas diseñadas fueron probadas como agentes inhibidores de la infección de VIH-1. Para pNL4.3 y pNL4.3DIM, cepas cuya resistencia a T20 ha quedado demostrada⁹⁷, encontramos actividades inhibitorias de covREC-NTP y T20 dentro del mismo orden de magnitud. Sin embargo, comparados con covNHR-ER y covNHR-VQ⁹⁷, con IC₅₀ de 5 nM y 2 nM, respectivamente, es una actividad reducida. Uno de los mayores problemas derivados de la poca estabilidad que presenta covREC-NTP, es que los experimentos de inhibición están hechos a temperatura de 37°C, a la que se incuban las proteínas junto con los pseudovirus y las células durante al menos 24h. A esa temperatura, la proteína covREC-NTP puede estar parcialmente desnaturizada y si la mantenemos durante horas en esa temperatura puede proseguir su desnaturización, (recordemos que su T_m es de 41°C), por lo tanto, durante el ensayo es probable que exista una disminución en la concentración de proteína efectiva. Esto quiere decir que los valores de IC₅₀ obtenidos pueden estar afectados por una concentración real de proteína activa reducida. Sin embargo, el simple hecho de que la proteína covREC-NTP tenga capacidad inhibitoria a pesar de que un gran porcentaje de moléculas no se encuentren plegadas es un dato muy destacado, ya que esta proteína no contiene el bolsillo HP. Teniendo en cuenta estos resultados, una posible mejora en la estabilidad térmica de covREC-NTP podría provocar un aumento en la afinidad por Y24L, así como un aumento

en su capacidad inhibidora, generando una nueva familia de inhibidores potentes derivados de covNHR-VQ con un tamaño reducido.

Por el contrario, covREC-HP no es capaz de inhibir ninguna de las cepas de VIH-1 usadas en los ensayos, a pesar de su alta estabilidad y de tener una afinidad por su diana peptídica del mismo orden de magnitud que covREC-NTP. Con lo que, aun teniendo accesible su región diana en algún momento durante el proceso de fusión, y aún siendo esta exposición de manera transitoria, la proteína no es capaz de actuar como inhibidor.

Por lo tanto, como conclusión, podemos destacar que no es necesaria la presencia del bolsillo hidrofóbico para generar inhibición, aunque esta actividad inhibidora es reducida. Además, comprobamos que la región del bolsillo hidrofóbico por sí sola o en conjunción con la región C-terminal no permite conseguir capacidad inhibidora en ausencia de otras interacciones, debido posiblemente a que su secuencia de CHR diana no se encuentra accesible o es transitoriamente accesible en una ventana de tiempo muy reducida. La potente actividad inhibidora de covNHR-ER, que además del bolsillo HP presenta intacto el bolsillo intermedio, indica que es necesaria la cooperación de al menos dos bolsillos (NTP+intermedio ó HP+intermedio) inhibir la fusión. Esto atribuiría un papel central al bolsillo intermedio de NHR en la actividad inhibidora de estas proteínas, probablemente mediando una iniciación de interacciones con la región CHR parcialmente expuesta, que posteriormente se propagan en la estructura coiled-coil mediante la participación de otros bolsillos.

5.5 Conclusiones

- La división de covNHR-VQ en dos miniproteínas que exponen diferentes bolsillos de unión a CHR ha sido exitosa. Las proteínas resultantes se pliegan con estructura helicoidal y están en forma monomérica según el modelo de diseño. Sin embargo, mientras que covREC-HP, correspondiente a la región C-terminal de covNHR-VQ es muy estable, la proteína covREC-NTP, correspondiente a la región N-terminal presenta una estabilidad baja.
- Ambas proteínas interactúan con los péptidos correspondientes a su diana en la secuencia de CHR, con una afinidad en el rango micromolar. Sin embargo, covREC-NTP sufre una estructuración en la interacción con Y24L, lo que puede estar afectando a la afinidad.
- Los estudios funcionales indican que el bolsillo hidrofóbico y el bolsillo C-terminal, presentes en CovREC-HP, no son suficientes para generar actividad inhibitoria. Mientras que, sí se puede alcanzar cierta actividad con los bolsillos intermedio y N-terminal, presentes en covREC-NTP. Estos resultados sugieren un mecanismo de inhibición en el que el bolsillo intermedio juega un papel central.

Capítulo 6 :

Estabilización de la proteína covREC-NTP mediante la inserción de un puente disulfuro

6.1 Introducción

En el capítulo anterior hemos visto que una proteína de tamaño reducido (11kDa), que contiene únicamente los bolsillos de interacción N-terminal e intermedio, es capaz de generar actividad inhibitoria significativa frente a pseudovirus, aún teniendo una baja afinidad por su secuencia diana de CHR (0,8 μ M) y una especial sensibilidad a la temperatura, con una T_m de 41°C aproximadamente. Durante el desarrollo previo de las proteínas covNHR, se ha demostrado que un aumento de la estabilidad de la proteína provoca a un aumento de la afinidad de dicha proteína por su péptido diana y un incremento en su actividad inhibidora⁶¹. Por lo tanto, nos propusimos aumentar la estabilidad térmica de la proteína covREC-NTP y ver si esta estabilización podría llevar a un aumento de afinidad en la interacción con Y24L, así como a un aumento en su potencial inhibidor.

Es por ello que se plantearon mutaciones que pudieran incrementar la temperatura de desplegamiento de la proteína. Existen dos métodos para afrontar el problema, el primero es realizar mutaciones en la estructura que sean capaces de generar interacciones estabilizantes^{61,118}. Otra manera de estabilizar la estructura plegada es mediante la sustitución de aminoácidos por Cys en posiciones que permitan formar un puente disulfuro en condiciones oxidantes que estabilice la estructura plegada^{119,120}. La ventaja de formar el puente disulfuro es que es un enlace covalente que requiere mucha más energía para romperse que las interacciones no covalentes como las electrostáticas o los puentes de hidrógeno. El mecanismo principal de estabilización por puentes disulfuro consiste en que la reducción en la entropía conformacional del estado desplegado impuesta por la ligadura covalente de la cadena resulta en un aumento en la energía de Gibbs de desplegamiento y, por tanto, de la estabilidad de la proteína. Por su efectividad es muy empleado para la estabilización de enzimas en la industria¹²¹.

La elección de las mutaciones de dos aminoácidos a Cys en covREC-NTP es complicada, ya que la posición del puente disulfuro podría perturbar la interacción con el péptido diana. Por ello las zonas en las que se pueden dar esas mutaciones se reducen considerablemente. Primero, hay que evitar añadir las mutaciones en el interior de las hélices 1 y 3, ya que éstas son las que se encuentran en disposición paralela y generan la superficie de contacto con el péptido diana Y24L. También debemos tener en cuenta la distancia entre aminoácidos necesaria para que se lleve a cabo la formación del puente disulfuro, ya que éste solo se formará entre Cys que estén a una distancia de entre 3,8-

6,6Å¹²². Por último, el puente disulfuro debe ligar dos elementos estructurales de la proteína que estén distantes en la secuencia de forma que su formación estabilice el motivo de plegamiento. En análisis computacional del modelo estructural de covREC-NTP nos permitió identificar dos posibilidades para llevar a cabo las mutaciones. La primera mutación a Cys se realizaría en Gly32, en el primer lazo de conexión entre las hélices 1 y 2, mientras que para la segunda mutación encontramos dos posibilidades, Thr 92 y Arg 93 en la región C-terminal de la tercera hélice, como se muestra en la figura 6.1.

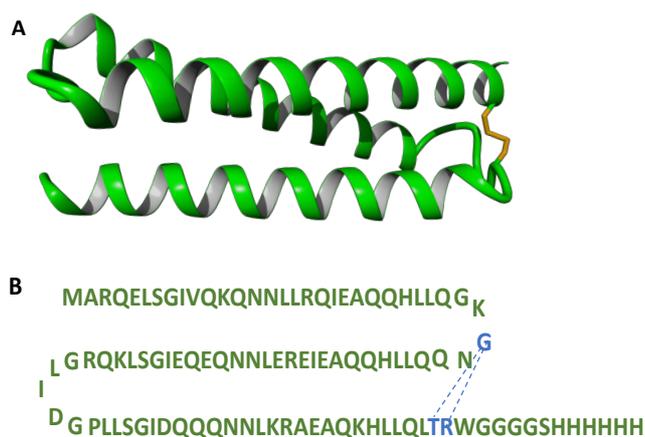


Figura 6.1. Representación del modelo de la estructura de covREC-NTP, panel A, mostrando una posible posición del puente disulfuro. Secuencia de aminoácidos de covREC-NTP, resaltando en azul los puntos donde se pueden realizar las mutaciones a Cys para generar un puente disulfuro, panel B.

Ya que el análisis computacional no permitía discernir una clara diferencia entre los dos posibles mutantes de covREC-NTP, decidimos producir las dos variantes y evaluarlas a la vez. Por un lado, covREC-NTP_{G32C-T92C}, a partir de ahora llamada RECCys-T, y covREC-NTP_{G32C-R93C}, a partir de ahora llamada RECCys-R. Por lo tanto, se decidió apostar por la caracterización biofísica de ambas y, de no existir ninguna diferencia reseñable entre ellas, probar la capacidad inhibidora de las dos variantes.

6.2 Objetivos

- Producir las nuevas variantes de CovREC-NTP estabilizadas mediante el diseño de un puente disulfuro.
- Realizar la caracterización biofísica de las dos nuevas proteínas, comparando la estabilidad de las formas oxidada y reducida.
- Caracterizar la termodinámica de la interacción de las proteínas con el péptido Y24L.
- Realizar el estudio funcional de ambas proteínas, comprobando la capacidad de unión a estructuras ENV nativas, y su capacidad de inhibición de la infección in vitro por pseudovirus.

6.3 Resultados

6.3.1 Expresión y purificación

Las pruebas de expresión de las nuevas variantes se realizaron con la cepa de *E.coli* BL21 a una temperatura de 27°C, variando el tiempo de incubación, entre 4 horas y O/N, y probando dos concentraciones de IPTG, 0,1 mM y 0,5 mM. Se analizan los cultivos para determinar dónde se concentra una mayor expresión de las proteínas, bien en la fracción soluble (FS) o bien en cuerpos de inclusión (IB). Como podemos observar en la figura 6.2, ambas proteínas se expresan bien en todas las condiciones probadas. El tamaño que indica la posición de la banda en la electroforesis corresponde al peso molecular esperado, 11,9 kDa.

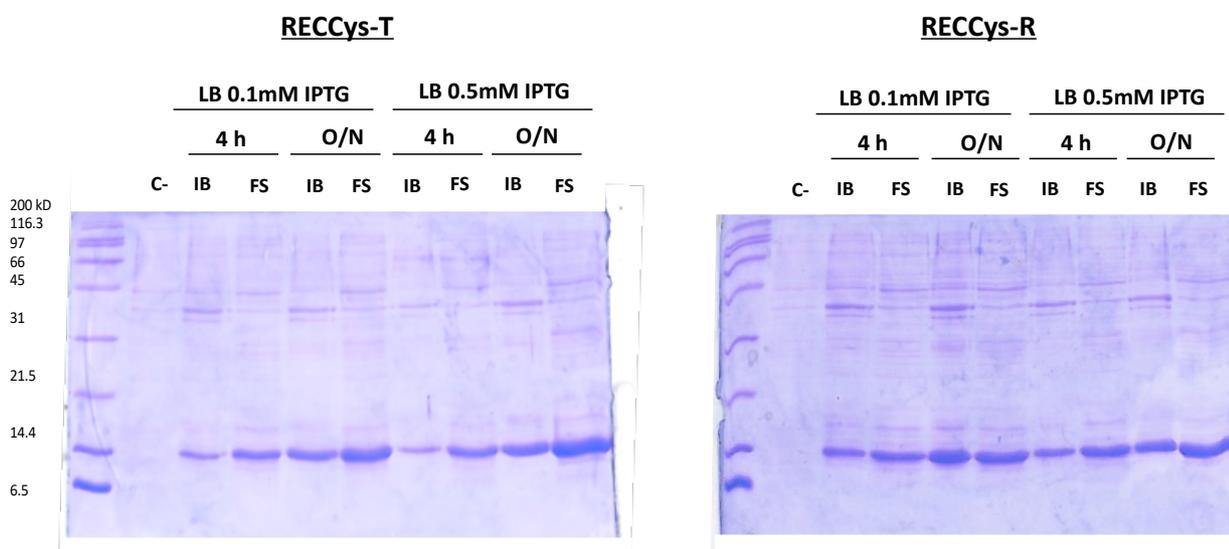


Figura 6.2. Geles de PAGE-SDS para las pruebas de expresión de las variantes con puente disulfuro de covREC-NTP.

Los resultados muestran una mayor expresión en ambas proteínas utilizando 0,5 mM de IPTG e incubando O/N. La mayoría de las proteínas se acumulan en la fracción soluble. Con estas condiciones de expresión, se escaló la producción y ambas proteínas se expresaron con un buen rendimiento, aproximadamente 4 mg por litro de cultivo, y se purificaron utilizando los protocolos cromatográficos descritos anteriormente en capítulos anteriores hasta alcanzar una alta pureza. En estos casos, todas las etapas de purificación se llevaron a cabo en condiciones reductoras en presencia de 10 mM β -mercaptoetanol como agente reductor en todos los tampones. Al finalizar la purificación,

las proteínas se encuentran reducidas en tampón Tris 50 mM, NaCl 25 mM pH 7,5, 10 mM β -mercaptoetanol.

Para comprobar la formación espontánea del puente disulfuro, se realizó un cambio de tampón mediante diálisis, a tampón fosfato 50 mM, pH 7,4, en ausencia el agente reductor y, una vez finalizada la diálisis, se comprobó la efectividad en la formación del enlace disulfuro mediante un ensayo con el reactivo de Ellman (ref.22582 Thermofischer). Como resultado obtuvimos menos del 20% de Cys presentes en estado reducido, lo que indica la correcta formación del puente disulfuro.

6.3.2 Caracterización biofísica de las nuevas variantes

6.3.2.1 Estructura y estabilidad de las proteínas por CD y tamaño molecular por DLS

Una vez finalizado el proceso de purificación y se obtuvieron las proteínas con un alto grado de oxidación se pasó a su caracterización estructural mediante dicroísmo circular (CD). Para ello, se comprobó en ambas proteínas el grado de estructura en α -hélice en condiciones oxidantes y reductoras (añadiendo al tampón TCEP, un agente reductor altamente estable a temperaturas elevadas) a un pH 7,4, en tampón NaPi 50mM. Además, se comprobó la estabilidad térmica de las dos proteínas y el grado de reversibilidad de su desnaturalización.

En la figura 6.3, observamos que existe una ligera diferencia en los espectros de far-UV CD entre la condición reductora y la condición oxidante para ambas proteínas (Panel A), en condiciones oxidantes obtenemos un mayor porcentaje de α -hélice. Además, vemos que las proteínas oxidadas se encuentran desplegadas a una temperatura de 90°C, y que su desnaturalización es altamente reversible, ya que el espectro de CD al volver a enfriar la muestra presenta una elipticidad sólo ligeramente inferior, (figura 6.3, panel B).

Si observamos las curvas de desnaturalización térmica, ambas se ajustan bien a un modelo de desnaturalización de dos estados, obteniéndose un valor de T_m de 62°C para ambas proteínas (Panel C). En condiciones reductoras se obtuvo una T_m de 45°C para ambas proteínas, sólo ligeramente superior a la de covREC-NTP en las mismas condiciones.

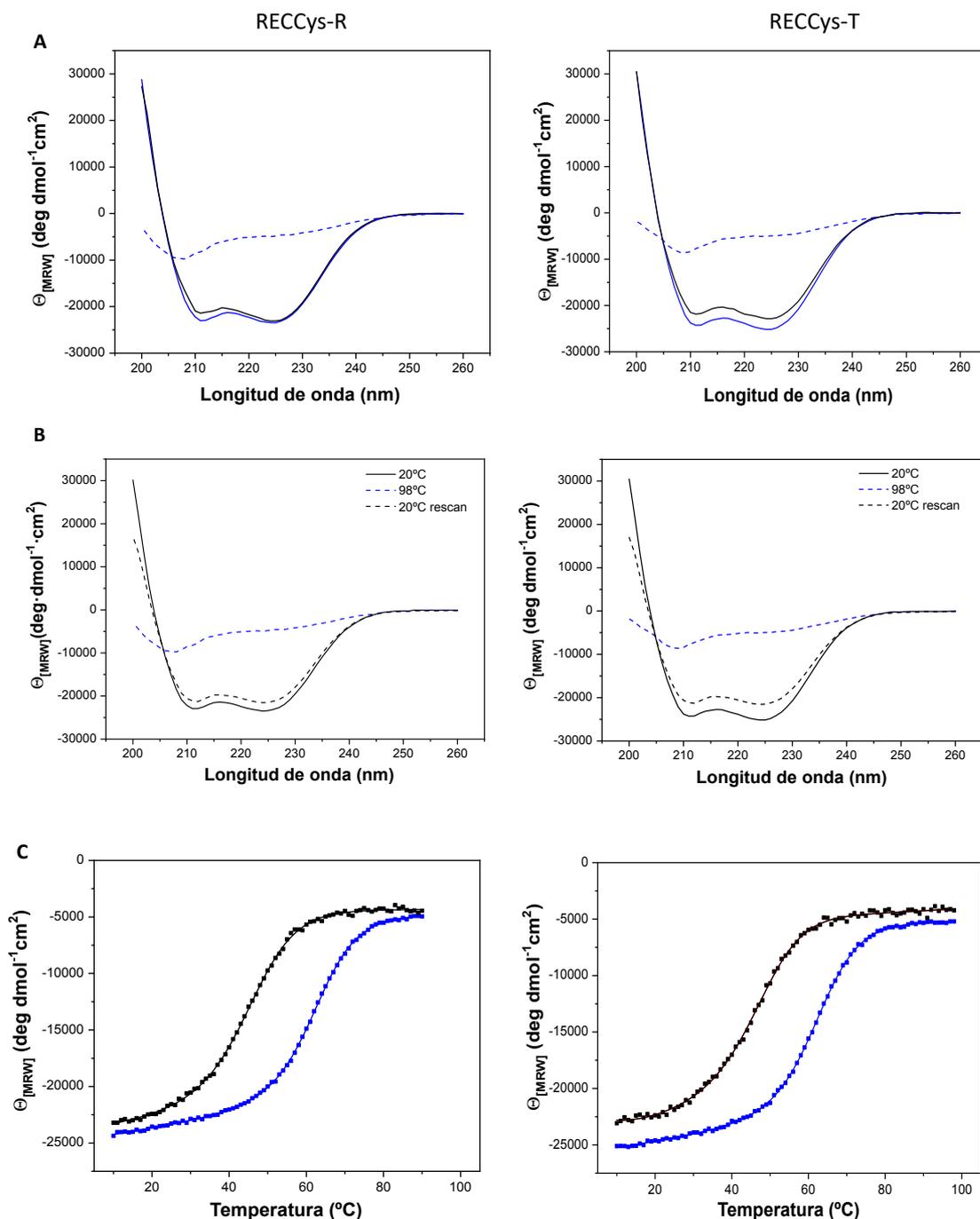


Figura 6.3. Panel A) Espectros de CD a 20°C de las proteínas oxidadas (azul) y reducidas (negro), en líneas discontinuas se muestra el espectro a 90°C. Panel B) Espectros de CD de las proteínas oxidadas antes y después de la desnaturalización térmica. Panel C). Desnaturalización térmica de las proteínas en estado oxidado (azul) y reducido (negro)

Como se ha descrito en el capítulo anterior para covREC-NTP, se estudió la estructura y la estabilidad térmica de las nuevas variantes en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica. Para comprobar los efectos del pH, figura 6.4, medimos los espectros de CD y realizamos los experimentos de desnaturalización térmica en 4 condiciones diferentes:

pH 4, 5, 6 y 7,4. Los efectos de la fuerza iónica se comprobaron añadiendo al tampón fosfato sódico una concentración de 100 ó 200 mM de NaCl, figura 6.5.

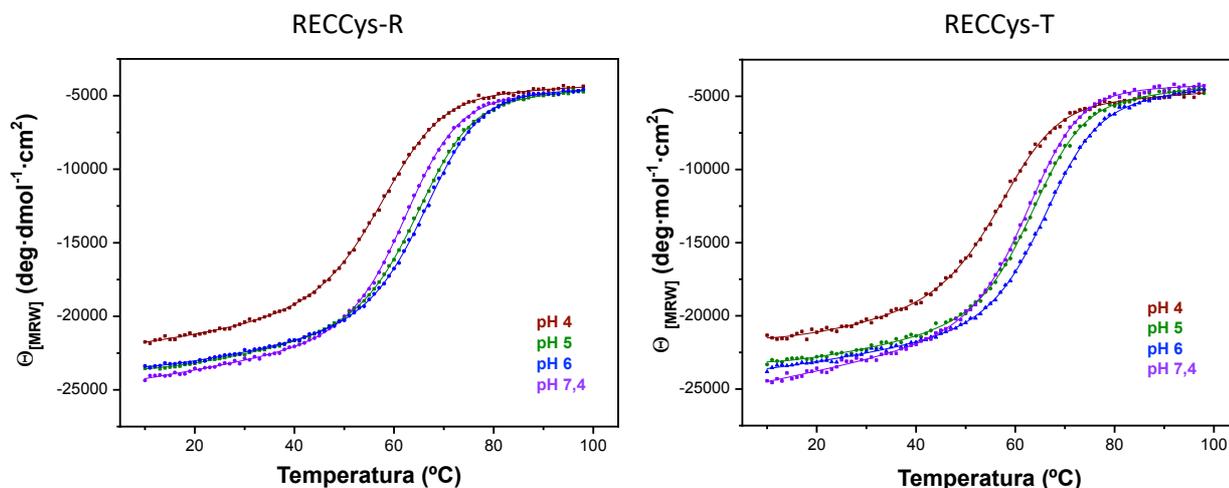


Figura 6.4. Desnaturalización térmica por CD en diferentes condiciones de pH. Los datos experimentales se representan con puntos, mientras que los ajustes de las curvas mediante el modelo de desplegamiento de dos estados se representan en líneas continuas.

Como podemos observar, no existen diferencias significativas que indique que alguna de las dos variantes es mejor que la otra, ni en estabilidad térmica ni mayor grado de plegamiento. Ambas proteínas tienen una T_m similar a cada pH entre 56-65°C, y un 60-67% de estructura en α -hélice, calculado según Luo and Baldwin⁷⁰, lo que indica una buena estabilidad y un grado de plegamiento adecuado en un amplio espectro de pH y fuerza iónica (Tabla 6.1).

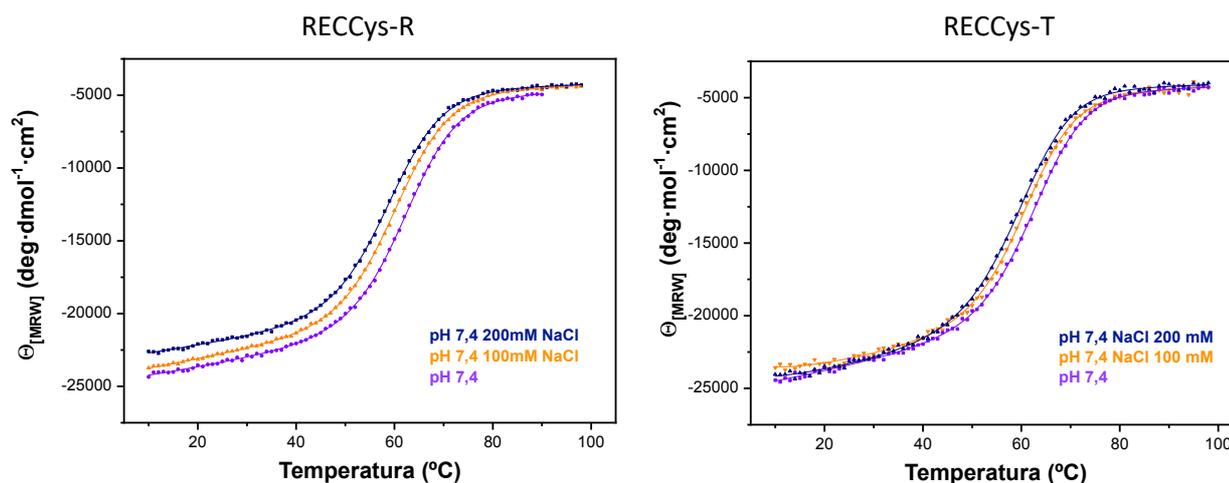


Figura 6.5. Desnaturalización térmica por CD de las dos variantes en tampón NaPi 50mM, pH 7,4 con diferente fuerza iónica.

Además del estudio de estabilidad y estructura en diferentes condiciones de pH y fuerza iónica, se realizó un estudio del estado oligomérico de las variantes en las diferentes condiciones.

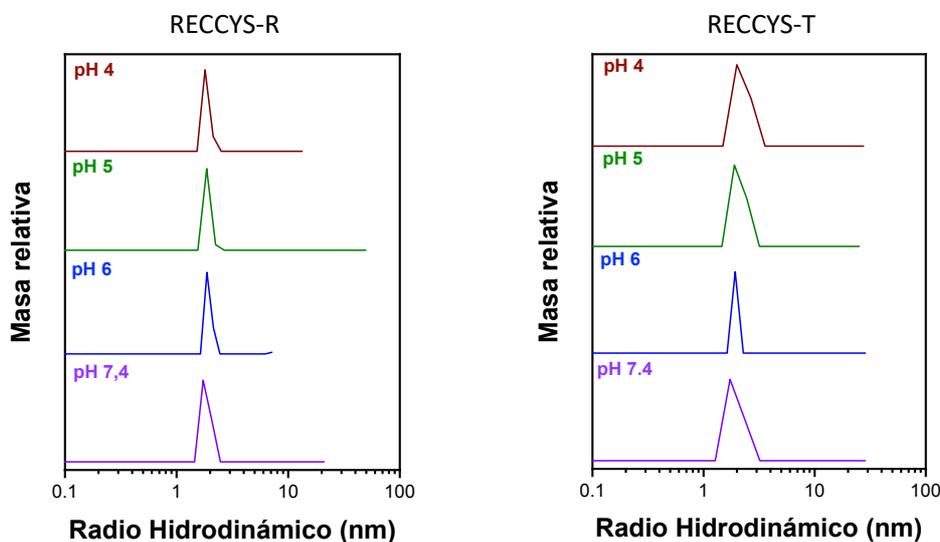


Figura 6.6. Experimentos de DLS con las proteínas dos proteínas en diferentes condiciones de pH.

Como podemos observar en la figura 6.6, el radio hidrodinámico se mantiene constante en un valor en tono a 1.9 nm compatible con el estado monomérico, en las diferentes condiciones probadas tanto de pH como de fuerza iónica, figura 6.7, lo que indica una buena estabilidad conformacional.

Los datos obtenidos para ambas proteínas, tanto de porcentaje de α -hélice, como de Tm y radio hidrodinámico, quedan recogidos en la tabla 6.1.

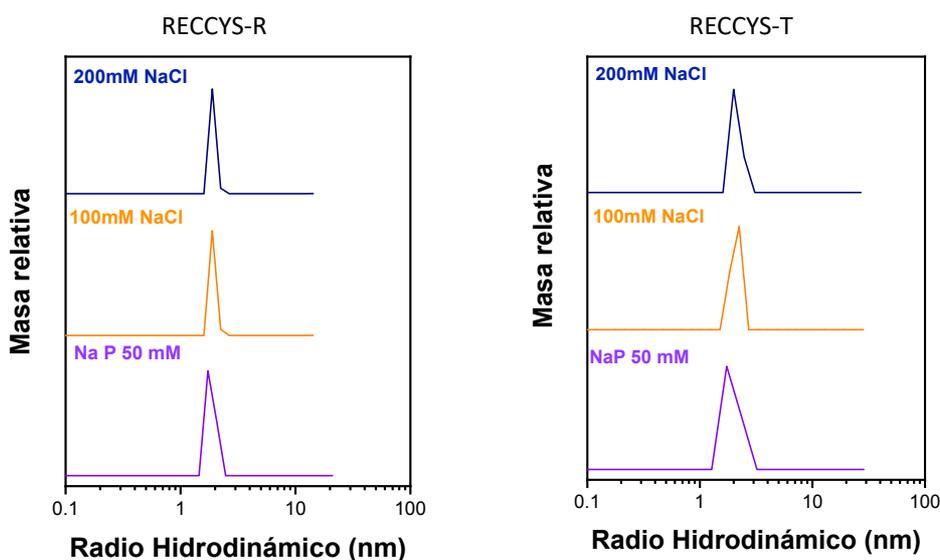


Figura 6.7. Experimento de DLS con las proteínas RECCYS en diferentes condiciones de fuerza iónica.

Tabla 6.1. Resumen de la estructura, tamaño y estabilidad térmica de las proteínas RECCys

Proteínas	pH/Fi	% α -hélice ¹	Tm (°C) ²	ΔH_{un} (kJ·mol ⁻¹) ²	Rh (nm)
RECCys-R	4	60	58,3 ± 0,2	142 ± 2	1,9
	5	65	65 ± 0,1	158 ± 2	1,9
	6	65	66,2 ± 0,1	161 ± 2	1,9
	7,4 ox/red	66/64	62,6/45	166 ± 2	1,8
	7,4 100 mM NaCl	65	60,8 ± 0,1	162 ± 1	1,9
	7,4 200 mM NaCl	65	59,3 ± 0,1	159 ± 2	1,9
	RECCys-T	4	60	57,6 ± 0,3	142 ± 4
5		64	64 ± 0,3	164 ± 3	1,9
6		65	66,8 ± 0,2	164 ± 2	1,9
7,4 ox/red		67/63	63/45	168 ± 3	1,9
7,4 100 mM NaCl		65	61 ± 0,2	163 ± 4	2
7,4 200 mM NaCl		66	59,5 ± 0,3	156 ± 5	1,9

¹ Valores obtenidos con el valor de elipticidad a 222 nm⁷⁰

² Datos obtenidos mediante el modelo de desplegamiento de dos estados detallado en ANEXOS

Con estos valores, podemos concluir que no existe una diferencia significativa que nos permita elegir una de las dos variantes como óptima para los estudios de caracterización termodinámica de la unión, así como, para los experimentos funcionales de unión a las proteínas ENV e inhibición del VIH. Por ello, todos los experimentos se realizaron con las dos proteínas, RECCys-R y RECCys-T.

6.3.3 Caracterización termodinámica de la unión a Y24L

6.3.3.1 Experimentos de unión mediante Dicroísmo Circular

Al igual que la proteína de la que derivan ambas variantes, los estudios termodinámicos de unión se realizaron con el péptido Y24L. Estos estudios se realizaron en tampón NaPi 50 mM pH 7,4.

Primeramente, se realizaron espectros de CD de la proteína libre y la proteína con el péptido con una relación molar 1:2. Como vemos en la figura 6.8, existe un aumento en la elipticidad molar negativa de las mezclas péptido-proteína con respecto a la suma de los espectros de la proteína y del péptido por separado. Esto indica la interacción entre proteína y péptido con la adquisición de estructura en hélice del péptido en el complejo.

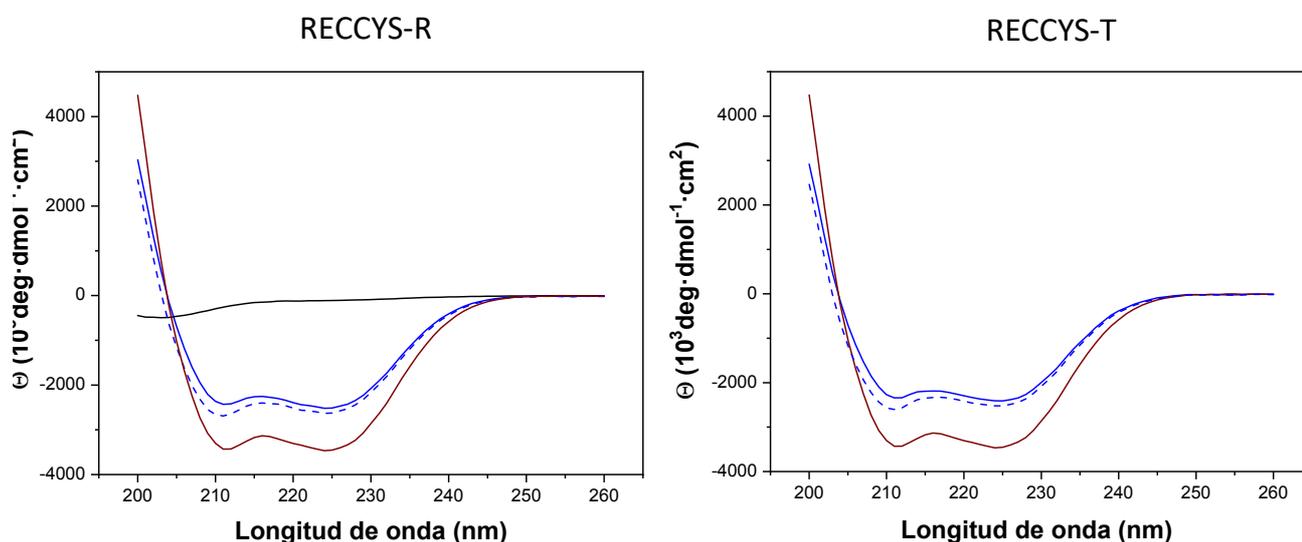


Figura 6.8. Espectros de Dicroísmo Circular de las proteínas libres (azul), y en presencia de Y24L (marrón) en una relación molar 1:2. En negro se muestra el espectro del péptido a la concentración en la que se encuentra en el complejo, y en discontinuo se representa la suma teórica de los espectros de la proteína y el péptido libres.

Realizamos experimentos de desnaturalización térmica con diferentes ratios molares de proteína-péptido para comprobar si existe un aumento en la T_m que correspondería a una estabilización mediada por la formación del complejo.

Como podemos observar en la figura 6.9, a medida que aumenta el ratio molar péptido:proteína, aumenta la elipticidad a baja temperatura. Sin embargo, no parece que la unión del péptido aumente la estabilidad térmica, ya que en los ajustes al modelo de desnaturalización de dos estados, la T_m se mantiene sobre los 60°C.

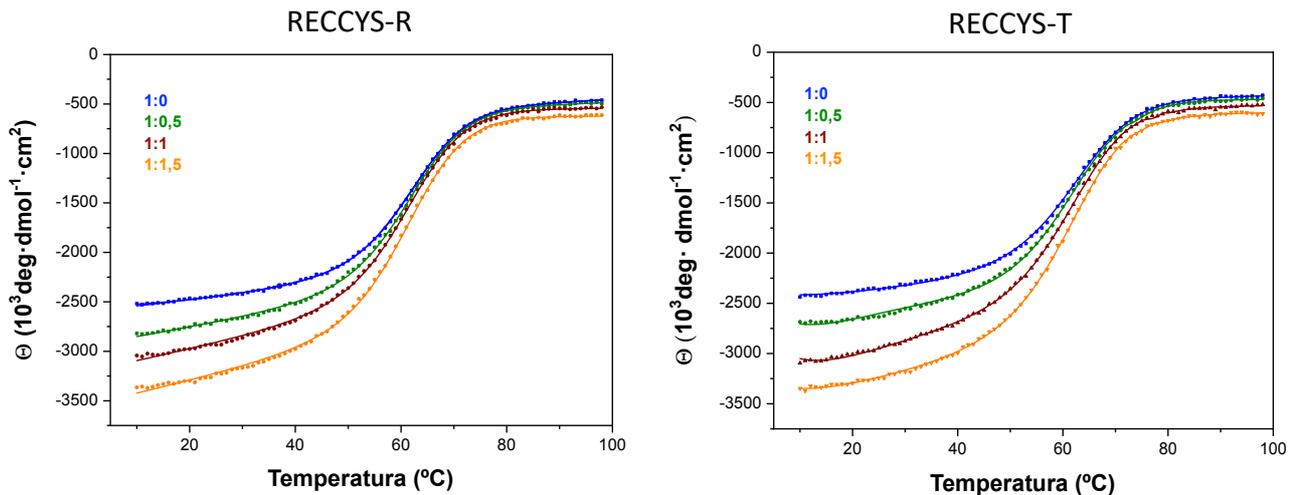


Figura 6.9. Desnaturalización térmica por CD de las proteínas libres y en complejo a diferente ratio molar, entre 1:0,5 y 1:1,5. Los puntos señalan los valores experimentales, mientras que las líneas continuas corresponden a las simulaciones derivadas de un modelo de desplegamiento de dos estados acoplado a la unión de ligando.

Las simulaciones realizadas con el modelo de desplegamiento de dos estados acoplado a la unión de ligando describen correctamente los datos obtenidos para los diferentes ratios proteína:péptido, usando los parámetros de unión obtenidos por ITC, que se describen más abajo.

6.3.3.2 Interacción mediante calorimetría isotérmica de titulación

Una vez comprobado que las proteínas se unen a Y24L mediante CD, realizamos experimentos de ITC para calcular los parámetros termodinámicos de dicha interacción. En primer lugar, se realizaron experimentos de ITC directos en tampón NaPi 50 mM y pH 7,4 a 25°C. Como vemos en la figura 6.10, ambas proteínas interaccionan con el péptido liberando una gran cantidad de calor, unas 20 kcal·mol⁻¹, es decir, unos 80 kJ·mol⁻¹, similar para ambas proteínas y de una magnitud similar a la obtenida para covREC-NTP. La afinidad por el péptido está en 1.1 μM para ambas proteínas a 25°C, similar a la de covREC-NTP. El resto de parámetros termodinámicos, como la energía de Gibbs, ΔG, y la entropía, TΔS, son también similares, ya que, como podemos observar en la figura 6.11, aunque la interacción RECCys-T – Y24L tiene valores de ΔH y TΔS ligeramente menores, teniendo en cuenta los errores experimentales, los parámetros no suponen una gran diferencia.

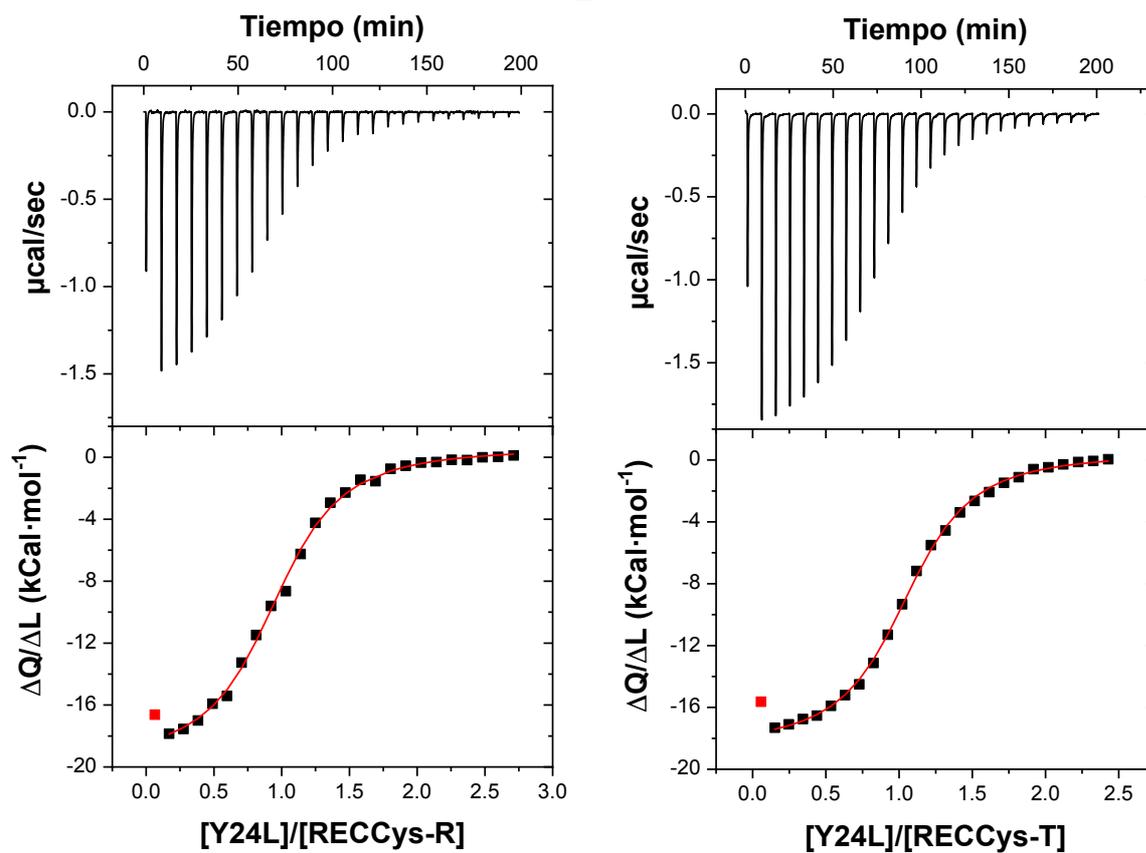


Figura 6.10. Experimentos ITC directos entre las proteínas RECCys-R y RECCys-T con el péptido Y24L, a 25°C.

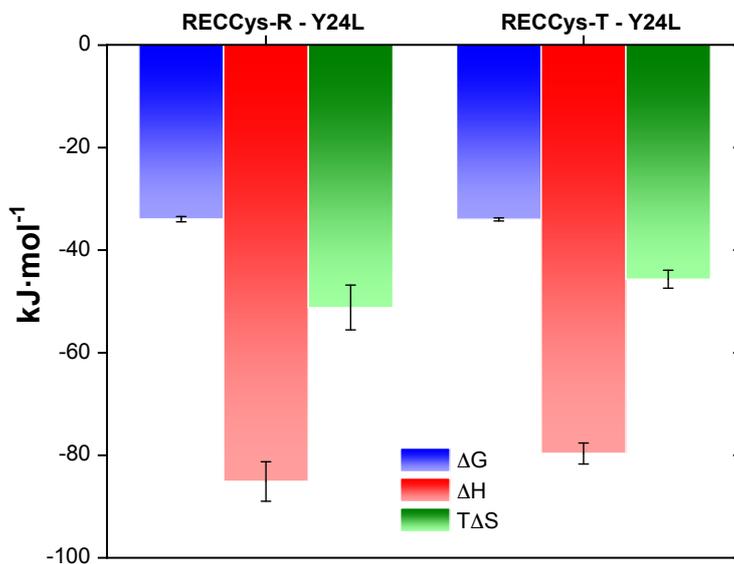


Figura 6.11. Huella termodinámica de la interacción del péptido Y24L con las proteínas RECCys. Las barras de error se obtienen a un 95% de confianza de los ajustes de los experimentos de ITC.

Además de estos parámetros termodinámicos, se calculó el cambio de capacidad calorífica de unión (ΔC_{p_b}) para ambas proteínas, realizando los experimentos de ITC directos a 3 temperaturas adicionales, 10, 15 y 20°C.

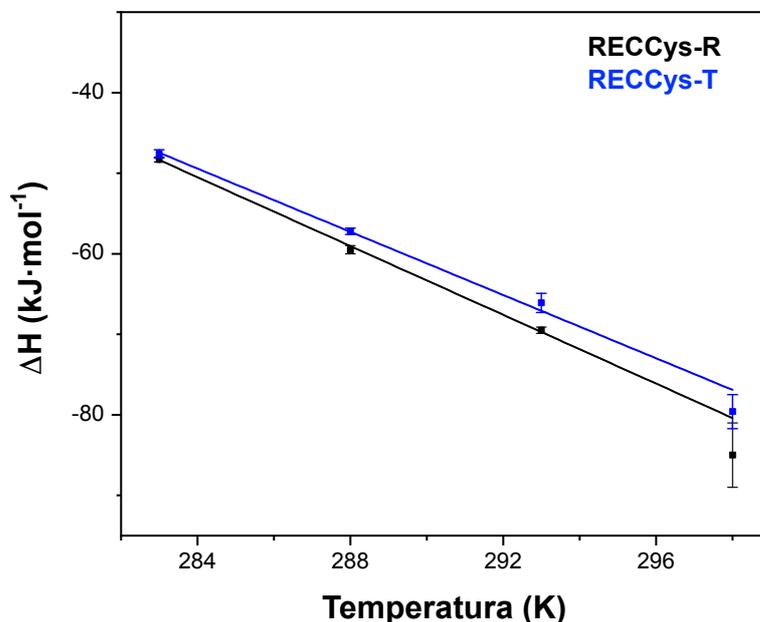


Figura 6.12. Cálculo de ΔC_{p_b} de las proteínas RECCys-R y RECCys-T con el péptido Y24L. Los puntos representan el valor experimental de ΔH para cada temperatura, la línea representa el ajuste lineal, cuya pendiente nos indica el valor de ΔC_{p_b} .

En la tabla 6.2 quedan recogidos todos los parámetros termodinámicos obtenidos por ITC de las distintas temperaturas a las que se realizaron los experimentos. Podemos ver que la afinidad de RECCys-T por Y24L es ligeramente menor que la de RECCys-R. Sin embargo, esas diferencias son mínimas y tienden a igualarse a medida que aumentamos la temperatura. Lo mismo sucede con la entalpía, aunque esas diferencias no son de más de 1-2 kJ·mol⁻¹.

Los valores de ΔC_{p_b} , -2,1 y -2 kJ·K⁻¹·mol⁻¹, coinciden dentro del error experimental, lo que indica que la superficie ocluida en la interacción, para ambas proteínas, es muy similar.

Al igual que ocurre con los estudios de caracterización biofísica, los estudios de interacción con el péptido Y24L no muestran diferencias significativas entre las dos proteínas. Ambas tienen estructuras y estabilidades muy similares, y la única diferencia estriba en dónde se encuentra el puente disulfuro. No es extraño por ello comprobar que su capacidad de interactuar con la secuencia diana de CHR no difiera entre ambas variantes proteicas.

Tabla 6.2. Parámetros termodinámicos de la interacción RECCys-R/T – Y24L

Complejo	Temperatura (°C)	Kd (μM)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	n	ΔCp b (kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹) ¹⁾
RECCys-R – Y24L	10	0,21 ± 0,01	-48,3 ± 0,3	0,99	-2,1 ± 0,3
	15	0,29 ± 0,02	-59,5 ± 0,5	0,94	
	20	0,51 ± 0,02	-69,5 ± 0,4	1,16	
	25	1,1 ± 0,3	-85 ± 4	1	
RECCys-T – Y24L	10	0,27 ± 0,02	-47,6 ± 0,5	1,04	-2 ± 0,4
	15	0,37 ± 0,02	-57,2 ± 0,4	0,83	
	20	0,53 ± 0,7	-66 ± 1,2	1,04	
	25	1,1 ± 0,2	-79,6 ± 2,1	1,1	

Todos los parámetros se ajustaron con unos datos de confianza del 95 %

6.3.4 Caracterización funcional de las proteínas RECCys

6.3.4.1 Estudios de unión a ENVs nativas estabilizadas de VIH-1 mediante ELISA

Al igual que con la caracterización de covREC-NTP, se comprobó la capacidad de unión de las proteínas RECCys-R/T a estructuras ENV solubles nativas, mediante experimentos ELISA directos. Estos experimentos fueron realizados a 25°C, con una concentración de proteína de 0.1 μg/mL. Como podemos observar en la figura 6.13. Tanto RECCys-R como RECCysT son capaces de interaccionar con las diferentes estructuras ENV nativas probadas. El porcentaje de unión tiene un rango desde el 20 al 80%, según la variante de ENV ensayada. Esta capacidad de unión es similar a la de covREC-NTP, lo que indica que la presencia del puente disulfuro no afecta a la interacción.

Cabe destacar que no existen diferencias que se puedan considerar significativas entre ambas proteínas, lo que es coherente con el hecho de que tienen estructuras idénticas y reconocen el mismo objetivo con afinidad similar.

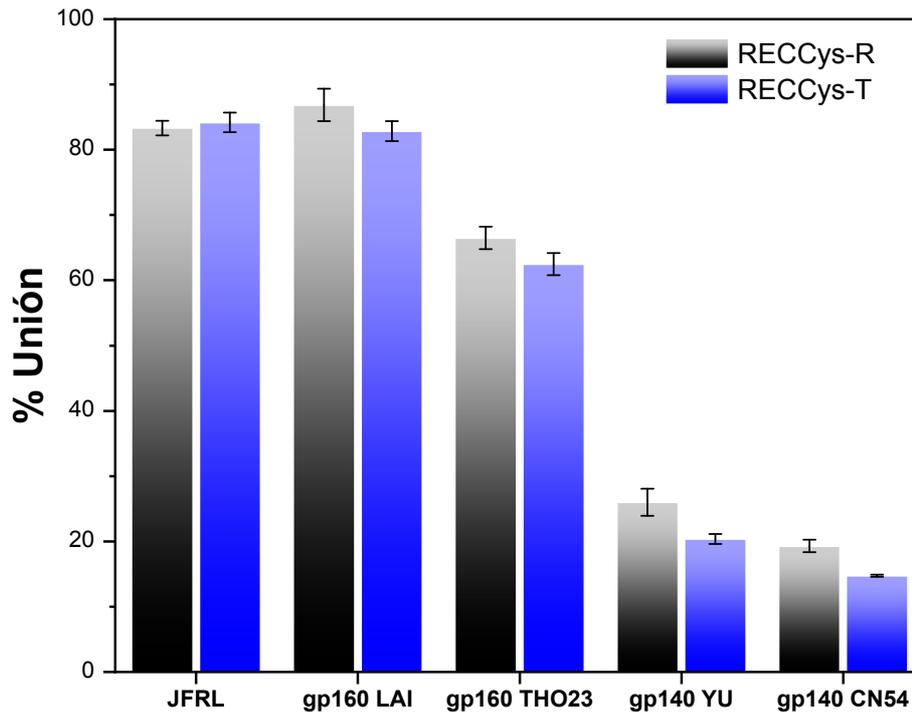


Figura 6.13. Resultados de los experimentos ELISA de unión de las proteínas RECCys probadas con diferentes estructuras ENV nativas. Las barras de error se obtuvieron de experimentos por triplicado.

6.3.4.2 Ensayos de inhibición de la infección con diferentes cepas de VIH-1

Una vez comprobada que la capacidad de unión a ENV nativas se mantiene intacta al añadir el puente disulfuro, se pasó al análisis de la capacidad de bloquear la infección viral, mediante experimentos T_{ZM}-bl⁶⁷.

Se probaron 4 cepas diferentes de pseudovirus⁷⁴. En la figura 6.14 se muestra la inhibición obtenida para la cepa pNL4.3 DIM, resistente a T20. En ella podemos ver como la IC₅₀ de las nuevas variantes se reduce un orden de magnitud con respecto a T20 y covREC-NTP, llegando a ser de aproximadamente 30 nM. La capacidad inhibitoria con las demás cepas queda recogida en la tabla 6.3.

De los valores de IC₅₀ obtenidos, hay que destacar que las nuevas variantes, RECCys-R y RECCys-T, tienen una capacidad inhibitoria idéntica. Además, son capaces de inhibir cepas de VIH-1 resistentes a T20 con una elevada eficacia, e inhibir cepas que resistían la acción de covREC-NTP.

Tabla 6.3. Valores de IC50 (nM) de las proteínas en comparación con covREC-NTP y T20

<i>Pseudovirus</i>	covREC-NTP	RECCys-R	RECCys-T	T20
<i>PNL4.3XCS</i>	743±98	39±4	37±6	180±25
<i>PNL4.3DIM</i>	284±15	37±3	32±7	490±260
<i>SF162</i>	No inhibe	126±26	162±14	51±1
<i>MW965.26</i>	737±260	220±9	188±36	4±1

Valores obtenidos del ajuste de los datos de inhibición al ajuste sigmoïdal de Hill.

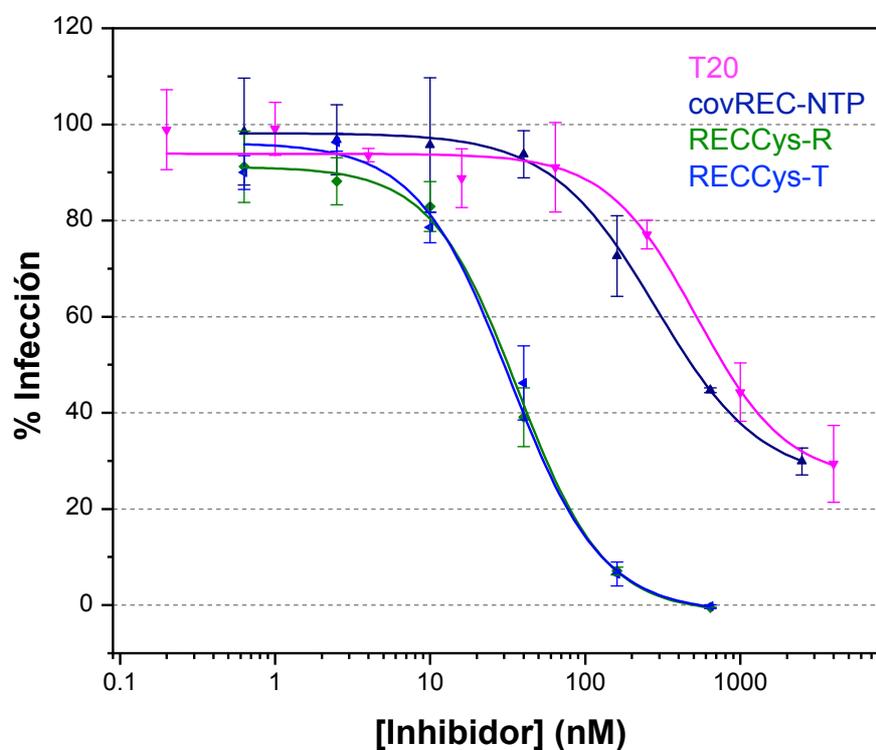


Figura 6.14. Resultados del experimento TZM-bl de inhibición en la cepa pNL4.3 DIM (resistente a T20). Los puntos muestran la media de los valores obtenidos por duplicado y la barra de error la desviación estándar. Las líneas representan el ajuste al modelo sigmoïdal de la ecuación de Hill.

6.4 Discusión

6.4.1 Estructura, tamaño y estabilidad térmica

El objetivo del diseño de estas dos nuevas variantes era aumentar la estabilidad térmica de la proteína covREC-NTP. Para ello se planteó una estrategia de diseño con la adición de dos cadenas laterales de Cys próximas espacialmente de modo que pudieran formar un puente disulfuro que estabiliza la estructura plegada en manojos de tres hélices. Como hemos podido comprobar, la estrategia ha sido un éxito, ya que no solo hemos mantenido la capacidad de producción de las proteínas, si no, que hemos logrado que se formara dicho puente disulfuro, permitiendo un aumento de T_m de aproximadamente 20°C , en comparación con covREC-NTP, cuya T_m se encontraba en torno a los 40°C . De los 20°C de aumento, cerca de $4\text{-}5^\circ\text{C}$ de estabilización corresponden solamente a las mutaciones de Cys en posición 32 y 92/93, ya que como hemos visto en la figura 6.3C, las proteínas en estado reducido presentan una T_m de 45°C . Los 16°C restantes, vienen dados por la formación del puente disulfuro entre las Cys. Matsumura y colaboradores cuantificaron la ganancia en estabilidad térmica, en términos de T_m , que conseguían añadiendo uno, dos o tres puentes disulfuro a una proteína. Con un puente disulfuro, conseguían un incremento de entre $6\text{-}13^\circ\text{C}$ aproximadamente¹²⁰. Un dato similar al obtenido en nuestras proteínas.

La estabilización de la proteína producida por formación del puente disulfuro no sólo se ve reflejada en el aumento de T_m , si no también en una mayor estabilidad estructural y térmica al someter a la proteína a cambios de pH y fuerza iónica.

En términos generales, el plegamiento de las proteínas covREC-NTP y las mutantes RECCys-R/T es el mismo, ya que su capacidad para formar α -hélice es prácticamente igual, $64\text{-}66\%$, por lo que la estructura y la superficie de contacto de la proteína no parece haber variado al añadir el puente disulfuro. Sin embargo, sí está claro que su formación provoca un aumento de la estabilidad en todos los sentidos.

Todos los datos sustentan que la formación del puente disulfuro ha cumplido con el objetivo principal planteado.

6.4.2 Capacidad de interacción con péptidos miméticos de CHR

Si tenemos en cuenta que la superficie de contacto de las nuevas variantes no difiere de la superficie de contacto de covREC-NTP, los parámetros termodinámicos de la interacción con el péptido Y24L, deberían ser similares entre las 3 proteínas.

A 25°C, las proteínas RECCys tienen la misma Kd, 1,1 μM , mientras que covREC-NTP tiene 0,8 μM , afinidades muy similares, dentro del error experimental. Lo mismo ocurre con las Kd a las demás temperaturas. Si comparamos los parámetros termodinámicos de las 3 proteínas, figura 6.15, vemos que esas diferencias no son muy relevantes.

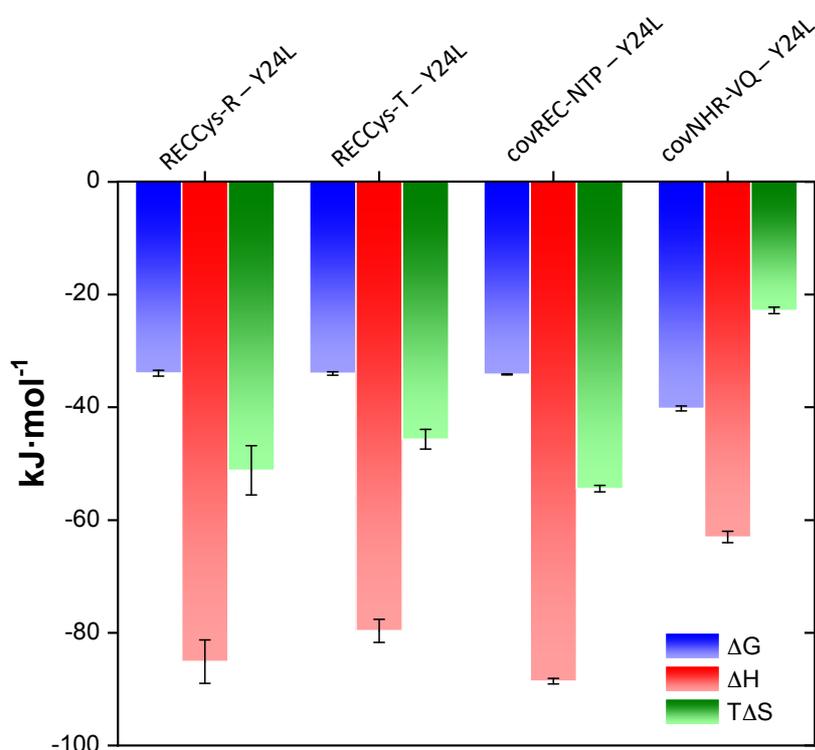


Figura 6.15. Comparación de los parámetros termodinámicos de la interacción entre covREC-NTP, covNHR-VQ y RECCys-R y T con el péptido Y24L a 25°C. Se incluyen también los parámetros para la unión del mismo péptido a la proteína covNHR-VQ.

Es cierto que existe una ligera diferencia en la entalpía de unión a Y24L. A 25°C la entalpía de unión de covREC-NTP e Y24L es $-89 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, mientras que para RECCys-R y RECCys-T son -85 y $-79 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, la mayor entalpía de unión de covREC-NTP puede verse influenciada por la cercanía a esta temperatura de la transición de su desnaturalización térmica, de forma que la unión del péptido implica una mayor rigidificación estructural de la proteína, lo que contribuye a una entalpía de unión más negativa. La mayor estabilidad de los mutantes de Cys con respecto a covREC-

NTP reduce esta influencia a 25°C. Esta interpretación viene corroborada por la mayor similitud de las entalpías de unión entre las tres variantes a temperaturas más bajas.

Donde más podemos apreciar el efecto de la estabilización de las proteínas sobre la termodinámica de unión es en la diferencia entre los valores de ΔC_{p_b} , la proteína covREC-NTP tiene un ΔC_{p_b} de $-2,8 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, mientras que las proteínas RECCys lo tienen de $-2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Como ya hemos discutido, el cambio de capacidad calorífica de unión está influenciado por la estabilización estructural de covREC-NTP por su interacción con Y24L, y que se observa en el aumento de T_m que tiene el complejo, figura 5.12 del capítulo anterior, lo que indica una estructuración y compactación de la proteína, tal y como también muestran los espectros de RMN de la forma libre y del complejo. Sin embargo, esta estabilización no se observa tan claramente en los complejos de Y24L con las nuevas variantes, ya que su T_m se mantiene en torno a 60°C. Que no se produzca un aumento de T_m en los complejos proteína:péptido se debe a los valores negativos de ΔH_b y ΔC_{p_b} , que provocan que exista un fuerte descenso gradual en la afinidad a medida que aumentamos la temperatura. Por lo que a 60°C la K_d del complejo adquiere un valor por el cual el péptido se encuentra prácticamente disociado, y lo que observamos es fundamentalmente la desnaturalización de la proteína libre.

Por otro lado, si comparamos los valores de ΔH y ΔC_{p_b} de las variantes RECCys-R con el de covNHR-VQ para la unión de Y24L, $-63 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $-1,6 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, descubrimos que RECCys-R y RECCys-T también parecen sufrir una estructuración significativa al interactuar con el péptido. Es posible que ambas proteínas mantengan una movilidad conformacional acusada en comparación con el dominio N-terminal de covNHR-VQ, debido a la reducción del tamaño de la estructura coiled-coil. Esto resulta en una mayor compensación entálpico-entrópica de la unión, que en este caso resulta menos favorable con una disminución destacable de la afinidad.

6.4.3 Unión a estructuras ENV nativas

Teniendo en cuenta los resultados de afinidad de las proteínas RECCys-R/T por el péptido Y24L en comparación con covREC-NTP, la capacidad de unión a las ENVs nativas que se observan para las dos nuevas variantes son los esperados. Coinciden con la unión registrada con covREC-NTP para las diferentes ENV, con porcentajes de unión prácticamente iguales, entre el 20-80%, teniendo menos capacidad de unión a las ENV gp140 CN54 y gp140 YU2. Es cierto que estas ENV son trímeros estabilizados truncados

en la región próxima a MPER, y en los que se ha suprimido la región transmembrana y la citosólica de gp41¹²³. La región suprimida puede influir en la pérdida de contactos o en la disminución de la accesibilidad de las proteínas, reduciendo así la unión. Sin embargo, la ENV JRFL-Wyatt es también un trímero bien caracterizado de gp140¹²³, que difiere estructuralmente en los puntos de estabilización y aún así, las proteínas sí son capaces de unirse con un elevado porcentaje con respecto al control, superior al 80%. Por lo tanto, no queda claro el motivo por el cual estas proteínas tienen ese descenso en la capacidad de unión, entre las diferentes ENV probadas. Si, por el contrario, comparamos la unión de estas moléculas con la unión obtenida para covNHR-VQ, (un porcentaje de unión para todas las ENVs superior al 80%), vemos que existe una correlación entre la afinidad que presentan estas moléculas por su péptido CHR diana y el porcentaje de unión obtenido. Es posible que la interacción se inicie en el bolsillo intermedio, y se propague hacia el bolsillo hidrofóbico y el polar. Si las proteínas presentan ambos bolsillos la unión será más eficiente que si solo presentan uno de ellos.

6.4.4 Capacidad inhibitoria frente a diferentes pseudovirus de VIH-1

Con los datos obtenidos en estos experimentos para la proteína covREC-NTP, se pensó que estabilizándola podríamos obtener mejores resultados de inhibición, debido a que a la temperatura a la que se lleva a cabo el ensayo la proteína está parcialmente desplegada. Si comparamos los resultados de los ensayos de inhibición obtenidos con RECCYS-R y RECCys-T, vemos que la hipótesis que planteamos en el capítulo anterior queda validada. En todas las 4 cepas de pseudovirus diferentes probadas, se observa una mejora en la IC₅₀ para las nuevas variantes estabilizadas. Ambas son entre 5 y 10 veces más potentes como inhibidores que covREC-NTP. Y en el caso de las cepas resistentes a T20, presentan una capacidad inhibitoria superior en un orden de magnitud a T20. De esta manera se demuestra que la baja capacidad de inhibición de covREC-NTP se debe en buena parte a su baja estabilidad térmica.

La IC₅₀ de compuestos pequeños, no peptídicos, estudiados por Shibo Jiang y colaboradores¹⁰⁷, revelan datos superiores, en el rango μM . Por lo que nuestras versiones proteicas reducidas tienen un mayor potencial.

Por otro lado, si comparamos los valores de IC₅₀ con los obtenidos con covNHR-ER o covNHR-VQ⁹⁷, vemos que RECCys-R y RECCys-T tienen entre 5 y 100 veces menos

eficacia inhibidora, dependiendo de la cepa del virus. Es decir, que la reducción de tamaño no mejora la capacidad de inhibición en la manera que esperábamos. Sin embargo, la reducción de tamaño ha implicado un descenso prominente en la afinidad de las proteínas por la región peptídica diana de CHR. Si covNHR-ER tenía una K_d por C34 de 14 nM y covNHR-VQ de 0,08 pM, las nuevas proteínas tienen una K_d de 1 μ M, dos órdenes de magnitud menos afin que covNHR-ER y de 7 órdenes de magnitud mayor a covNHR-VQ.

El mecanismo de inhibición propuesto para estas proteínas reside en la unión con la región CHR de gp41 y el bloqueo de la formación de la estructura 6HB⁴⁴. Es especialmente llamativo que para estas nuevas variantes proteicas tengamos una IC_{50} muy inferior a la K_d para la interacción con la diana, algo que no ocurre con covNHR-VQ o covNHR-ER. En el caso de los pseudovirus pNL4.3 y pNL4.3DIM la IC_{50} es de 35 nM mientras que la K_d por el péptido Y24L es de 1 μ M.

Root y colaboradores encontraron una falta de correlación entre los IC_{50} de la actividad inhibidora y las afinidades por sus respectivas dianas complementarias para una serie de mutantes de 5-helix y del péptido C37, aunque generalmente las IC_{50} eran muy superiores a las K_d ^{76,124}. Para explicar los resultados propusieron un modelo cinético de inhibición según el cual el estado intermedio de fusión de gp41 es sólo accesible al inhibidor de forma transitoria en una ventana de tiempo limitada entre la unión a CD4 y la formación del 6HB. Según este modelo la IC_{50} vendría dada por la siguiente ecuación:

donde k_{on} y k_{off} son las constantes de velocidad de asociación y disociación del inhibidor y la diana ($K_d=k_{off}/k_{on}$), k_f es la velocidad de ocultamiento de la diana y formación del estado final fusogénico, y k_s es la velocidad de desactivación de la gp41 provocada por el inhibidor. De esta forma, para inhibidores de muy alta afinidad, k_{off} es muy bajo y la IC_{50} alcanza un límite cinético marcado por $IC_{50}\approx k_f/k_{on}$, en el entorno de nM bajo. Esto es similar a lo que ocurre en nuestro estudio para covNHR-VQ⁹⁷. En cambio, para inhibidores de menor afinidad k_{off} es mucho mayor, $IC_{50}\approx(k_f/k_s)\cdot K_d$, de forma que la IC_{50} se correlacionaría con la K_d , ya que la rápida asociación-disociación del inhibidor permitiría alcanzar el equilibrio de unión con la diana en la ventana de tiempo en que ésta está accesible.

Tanto covNHR-ER como covREC-NTP presentan valores de IC_{50} para la cepa pNL4-3 del mismo orden de magnitud que sus respectivas K_d , lo que indicaría una relación k_f/k_s cercana a 1.

De acuerdo con este mecanismo de inhibición, K_d e IC_{50} deberían ser similares también para RECCys-R y RECCys-T. En cambio, la IC_{50} observada para las estas proteínas es 30 veces inferior a la K_d . Puesto es que estos inhibidores se encuentran en el límite de baja afinidad por su diana, esta observación se podría explicar si estos inhibidores fuesen especialmente eficientes para inactivar la gp41, de forma que su k_s sea más elevada que k_f . Una alternativa es que exista un mecanismo de inhibición diferente al planteado. Es posible que estas proteínas puedan acceder a su diana en un estado previo al estado intermedio de fusión, como sugieren los resultados de unión a las Env nativas. Por ello uno de los objetivos futuros que se derivan de este estudio es descubrir el mecanismo inhibitor de estas dos nuevas proteínas, ya que podrían estar inhibiendo la partícula viral en su estado pre-fusión, antes de que se lleven a cabo los cambios estructurales necesarios para que los trímeros NHR-CHR sean accesibles a otras moléculas inhibitoras de la fusión.

6.5 Conclusiones

- Las mutaciones generadas para la formación del puente disulfuro fueron efectivas en ambos diseños, tanto RECCys-R como RECCys-T.
- Las dos proteínas se pliegan correctamente en estructura helicoidal, son monoméricas y estables. El puente disulfuro provoca una estabilización térmica de aproximadamente 20°C.
- Las proteínas son capaces de interactuar con el péptido mimético de CHR, Y24L, con una Kd de 1µM, similar a la de covREC-NTP.
- Aunque la mejora en la estabilidad térmica no influye en una mejora de la afinidad, sí produce una mejora muy importante de la capacidad de inhibición, obteniéndose unos valores de IC50 de entre 0,03-0,2 µM.

Capítulo 7:
Resumen y Conclusiones

Resumen y Conclusiones

El VIH-1, agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, ha infectado hasta el momento 78 millones de personas, de las que 39 millones han fallecido, desde su descubrimiento a finales de la década de los 70 y principios de los 80.

En la actualidad, no existe una vacuna que pueda aportar protección efectiva frente a la infección, por lo que su tratamiento reside en la administración de un cóctel de inhibidores antirretrovirales capaces de mantener la carga viral en sangre controlada, teniendo que usarse de por vida. Sin embargo, la alta tasa de mutación del virus, acompañada con la administración prolongada de los antirretrovirales provoca la aparición de cepas resistentes al tratamiento. Por ello, el desarrollo de nuevos inhibidores capaces de actuar frente a esas cepas resistentes sigue siendo imprescindible.

Con ese objetivo general, esta tesis continúa el desarrollo y la caracterización de proteínas inhibitoras del VIH-1, dirigidas contra la proteína gp41. Estas moléculas, llamadas covNHR, fueron diseñadas previamente en el grupo de investigación como una única cadena polipeptídica que mimetiza la superficie del trímero NHR de gp41. Esto les permite interactuar con la región CHR de gp41 bloqueando los cambios conformacionales que llevan a la fusión entre la partícula viral y las células del organismo y evitando, de esta manera, la infección en su etapa más temprana. En esta Tesis se ha realizado un estudio termodinámico-estructural profundo de las proteínas covNHR, que nos ha permitido desentrañar de manera precisa las diferentes zonas o bolsillos de interacción con CHR y los factores termodinámicos que gobiernan dichas interacciones. El estudio se ha completado con un análisis de la capacidad de las proteínas para interactuar con sus dianas en la proteína Env nativa y de inhibir diversas variantes del VIH-1. Los resultados aportan detalles moleculares sobre los mecanismos de inhibición del VIH por estas moléculas y nos orientan para el diseño y mejora de nuevas proteínas, con el objetivo de la obtención de un posible inhibidor de la fusión que mejore al único fármaco hasta ahora aceptado para el tratamiento frente a la infección por VIH-1.

En el capítulo 3, se comparan dos proteínas, covNHR-VQ y covNHR-ER, que difieren en dos mutaciones (V10E y Q123R, equivalentes a V38E y Q40R en gp41). Estas mutaciones reproducen el efecto de mutaciones que confieren resistencia a los virus frente al único péptido inhibidor aprobado hasta el momento para su uso, T20 o enfuvirtide. En este capítulo analizamos cómo afectan esas mutaciones a la interacción de esas proteínas

con su región diana de CHR. El análisis termodinámico detallado mediante calorimetría de la unión de las proteínas y péptidos derivados de la región CHR, C34 y T20, ha revelado profundos cambios en la afinidad de 5 órdenes de magnitud, como consecuencia de los cambios locales en las interacciones provocados por las mutaciones en el sitio de resistencia a T20.

Hemos podido obtener la estructura de alta resolución del complejo covNHR-VQ:C34 por cristalografía de rayos-X, lo que nos ha permitido observar que la interfase de interacción NHR-CHR es virtualmente idéntica a la que presenta la estructura post-fusión de gp41. Además, existen moléculas de agua enterradas en la interfase entre el péptido y la proteína en la zona de resistencia a T20 que participan en una red de interacciones polares entre el péptido y la proteína que contribuyen a las afinidades extremas obtenidas. Estas moléculas estarían desplazadas por las mutaciones V10E y V123R, influyendo en la resistencia a T20.

En cuanto a los estudios de las proteínas como inhibidores, hemos visto que ambas proteínas pueden unirse a proteínas ENV nativas en su estado pre-fusión y tienen una capacidad de inhibición elevada, con valores de IC_{50} en un rango nM bajo, para un número variado de pseudovirus del VIH-1, incluso cepas resistentes a T20. Aunque covNHR-VQ presenta una mayor unión a ENV y es ligeramente más eficiente como inhibidor, estas diferencias no están de acuerdo con la enorme diferencia de afinidad por los péptidos CHR, lo que indica que las interacciones en el sitio de resistencia de T20 no son imprescindibles para alcanzar la inhibición del virus, al igual que no lo son tampoco para mantener la infectividad por los virus resistentes.

La gran similitud entre las estructuras post-fusión de gp41 y la estructura formada por el complejo covNHR-VQ:C34 nos ha llevado a realizar una caracterización más detallada de dicha interacción mediante dicroísmo circular y calorimetría isotérmica de titulación, diseccionando la termodinámica de unión de las diferentes regiones o sitios de contacto en covNHR-VQ usando péptidos miméticos de la región CHR de diferentes longitudes. Estos resultados se encuentran en el capítulo 4. La superficie de unión en covNHR se puede dividir en 4 regiones de contacto diferenciadas, un bolsillo N-terminal, un bolsillo intermedio, un bolsillo hidrofóbico y un bolsillo C-terminal. La caracterización de dichos bolsillos se ha realizado mediante el estudio de la interacción con 8 péptidos derivados de la región CHR que abarcan uno, dos o tres de los bolsillos de NHR. Los resultados indican que el número de bolsillos implicados en la unión es esencial para obtener

afinidades proteína:péptido relevantes, ya que en aquellos péptidos cuya secuencia abarca solo una de las cuatro regiones, no se observa unión o se detecta una unión muy débil, como en el caso del péptido W13S, que interacciona sólo con el bolsillo hidrofóbico. Sin embargo, los péptidos que interactúan con dos regiones en covNHR-VQ, tienen aumentada su afinidad hasta un rango μM o mayor. Y si una de las regiones de contacto es el bolsillo intermedio, la afinidad aumenta hasta obtener valores de K_d de 60-90 nM, lo que confiere a este bolsillo un papel clave en la interacción. Además, las regiones de interacción muestran cooperatividad, ya que las energías de unión no son aditivas, sino que muestran una sinergia al incluirse sucesivamente interacciones en bolsillos de contacto con los péptidos CHR.

La existencia de una comunicación de tipo alostérico entre los bolsillos N-terminal e hidrofóbico, distantes entre sí, se ha demostrado al observarse un aumento de afinidad de péptidos que abarcan el bolsillo hidrofóbico en covNHR-ER, que tiene ocluidas las interacciones en el bolsillo NTP mediante las mutaciones V10E y Q123R.

En el capítulo 5, se ha llevado a cabo la división de la proteína covNHR-VQ en dos miniproteínas que contienen, cada una, dos de los cuatro sitios de unión con CHR. La proteína covREC-NTP contiene el bolsillo N-terminal y el bolsillo intermedio, y la proteína covREC-HP contiene el bolsillo hidrofóbico y bolsillo C-terminal. La estabilidad térmica de estas miniproteínas medida por CD nos indica que la proteína covREC-NTP es mucho menos estable que la proteína covREC-HP. Sin embargo, ambas proteínas presentan un estado monomérico y un tamaño molecular adecuado.

Por otro lado, ambas proteínas son capaces de interactuar con sus dianas CHR respectivas, aunque presentando ambas una K_d similar en torno a μM . Sin embargo, la interacción de covREC-NTP con su diana está fuertemente influida por su baja estabilidad conformacional.

Si pasamos a la caracterización funcional, covREC-NTP es capaz de unirse a diferentes estructuras ENV solubles, y es capaz de generar cierta inhibición en algunas cepas de pseudovirus de VIH-1, a pesar de su baja estabilidad y afinidad de unión. Por el contrario, covREC-HP no es capaz de unirse a las estructuras ENV, ni es capaz de inhibir la infección. Lo que podría sugerir que su diana molecular en las ENV y los virus no se encuentra accesible.

Con todo ello, y sabiendo que la proteína covNHR-ER sí genera inhibición a pesar de que los determinantes de unión del bolsillo hidrofóbico se podrían encontrar inaccesibles,

como demuestra la no unión ni inhibición de covREC-HP. El bolsillo intermedio, que comparten covNHR-ER y covREC-NTP, parece ser un punto clave en el que se inicie y se propague la unión de estas moléculas a sitios de unión adyacentes, y que derive finalmente en la inhibición de la infección.

Durante todo el proceso del diseño y desarrollo de estas moléculas, una ganancia de estabilidad se ha relacionado siempre con un aumento de la afinidad de las proteínas por su diana, y viceversa. Puesto que en covREC-NTP la afinidad por su diana y su actividad inhibidora parecen estar comprometidas por su baja estabilidad conformacional, en el capítulo 6 desarrollamos la estabilización de covREC-NTP mediante la adición de un puente disulfuro para comprobar si de esta manera podríamos generar mayor afinidad y por lo tanto mayor capacidad inhibitoria. Se generaron dos nuevas variantes de proteínas a las que se añadieron dos restos de cisteína capaces de generar un puente disulfuro. Ambas proteínas se pudieron producir y purificar y se confirmó la formación del puente disulfuro en ambas. El estudio de su estabilidad térmica dio como resultado un aumento en 20°C de la T_m, pasando de 40 a 60°C en ambas proteínas. Sin embargo, este aumento en la estabilidad no significó un aumento de afinidad, manteniendo una K_d similar por el péptido CHR Y24L de 0,8-1 μM.

La unión de estas proteínas estabilizadas a estructuras ENV es también similar a la obtenida por covREC-NTP. Sin embargo, lo más llamativo es la reducción del valor del IC₅₀ de inhibición de VIH de estas moléculas con respecto a covREC-NTP, llegando a ser hasta 30 veces menor que el valor de K_d. Esto podría sugerir un mecanismo de inhibición diferente al planteado para los inhibidores de fusión dirigidos contra gp41.

Finalmente, las conclusiones más destacadas de este estudio son:

1. Las proteínas covNHR tienen una elevada estabilidad y mimetizan con gran precisión la estructura y la superficie del trímero nativo hélices NHR de gp41 para su unión a la región CHR.
2. Dos moléculas de agua interfacial juegan un papel clave en las interacciones relacionadas con la aparición de resistencia a los péptidos CHR.

3. Los bolsillos más prominentes que presenta la región NHR de gp41, el HP y el NTP, por sí solos no son dianas en las que centrarse de manera exclusiva si queremos diseñar péptidos inhibidores que tengan alta afinidad, ya que péptidos dirigidos a cada uno de ellos de forma aislada presenta nula o baja afinidad.
4. Se necesitan de un numero mínimo de regiones de interacción que abarquen al menos dos de estos bolsillos para obtener afinidades del rango nM.
5. Se ha observado una cooperatividad de unión significativa entre los diferentes bolsillos e incluso un efecto alostérico entre bolsillos distantes como el NTP y el HP.
6. El bolsillo hidrofóbico y el bolsillo C-terminal, presentes en CovREC-HP, no son suficientes para generar actividad inhibidora. Sin embargo, sí se puede alcanzar cierta actividad con los bolsillos intermedio y N-terminal, presentes en covREC-NTP. Estos resultados indican un mecanismo de inhibición en el que el bolsillo intermedio juega un papel central como sitio de iniciación de la interacción.
7. La estabilización de las proteínas derivada de la adición de un puente disulfuro provoca un aumento en su capacidad inhibitoria.
8. Estas proteínas son modelos de estudio extremadamente útiles para investigar los determinantes moleculares de la inhibición de la fusión dirigida a gp41.

Bibliografía

1. Kanki, P. J., Hopper, J. R. & Essex, M. *The Origins of HIV-1 and HTLV-4/HIV-2*.
2. Homma, T. *et al.* Lymphoma in macaques: Association with virus of human T lymphotropic family. *Science (80-.)*. **225**, 716-718 (1984).
3. Hirsch, V. *et al.* Cross-reactivity to human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus and molecular cloning of simian T-cell lymphotropic virus type III from African green monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 9754-9758 (1986).
4. Chakrabarti, L. *et al.* Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* **328**, 543-547 (1987).
5. Albert, J. *et al.* A New Human Retrovirus Isolate of West African Origin (SBL-6669) and Its Relationship to HTLV-IV, LAV-II, and HTLV-IIIB. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**, 3-10 (1987).
6. Kanki, P. J. *et al.* Human T-lymphotropic virus type 4 and the human immunodeficiency virus in West Africa. *Science (80-.)*. **236**, 827-831 (1987).
7. ASCEMTOL. SIDA: el contador macabro que no para- 35 millones de muertes y subiendo. (2017).
8. Duesberg, P. H. Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: Correlation but not causation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 755-764 (1989).
9. Huang, K. Y. *et al.* Mother-to-child transmission of HIV: An 11-year experience in a single center and HIV prevention effectiveness in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* (2019). doi:10.1016/j.jfma.2019.05.001
10. Curran, James W., *et al.* Acquired Immunodeficiency syndrome (AIDS) asociated with Transfusions. *N. Engl. J. Med.* **310**, (1984).
11. Steckbeck, J. D., Kuhlmann, A. S. & Montelaro, R. C. C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: Functionally rich and structurally enigmatic. *Journal of General Virology* **94**, 1-19 (2013).
12. Suzuki, Y. & Suzuki, Y. Gene Regulatable Lentiviral Vector System. en *Viral Gene Therapy* (InTech, 2011). doi:10.5772/18155
13. Malim, Michael H, *et al.* Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expresion of the viral regulatory genes. *Nature* **335**, (1988).

14. Huang, F., et al. RNA helicase MOV10 functions as a co-factor of HIV-1 Rev to facilitate Rev/RRE-dependent nuclear export of viral mRNAs. *Virology* **486**, 15-26 (2015).
15. Perez-Zsolt, D. et al. Dendritic Cells From the Cervical Mucosa Capture and Transfer HIV-1 via Siglec-1. *Front. Immunol.* **10**, 825 (2019).
16. Masurier, C. et al. Dendritic cells route human immunodeficiency virus to lymph nodes after vaginal or intravenous administration to mice. *J. Virol.* **72**, 7822-7829 (1998).
17. Izquierdo-Useros, N. et al. Maturation of Blood-Derived Dendritic Cells Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capture and Transmission. *J. Virol.* **81**, 7559-7570 (2007).
18. Sanders, R. W. et al. Differential Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Distinct Subsets of Effector Dendritic Cells. *J. Virol.* **76**, 7812-7821 (2002).
19. Izquierdo-Useros, N. et al. HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
20. Ferguson, M. R., Rojo, D. R., Von Lindern, J. J. & O'Brien, W. A. HIV-1 replication cycle. *Clinics in Laboratory Medicine* **22**, 611-635 (2002).
21. Rice, A. P. Cyclin-dependent kinases as therapeutic targets for HIV-1 infection. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **20**, 1453-1461 (2016).
22. Micklem, K. J. & Pasternak, C. A. Surface components involved in virally mediated membrane changes. *Biochem. J.* **162**, 405-410 (1977).
23. Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A. & Buchbinder, S. HIV infection - Disease primer article. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 15035 (2015). doi:10.1038/nrdp.2015.35
24. Costin, J. M. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology Journal* **4**, (2007).
25. Dufloo, J., Bruel, T. & Schwartz, O. HIV-1 cell-to-cell transmission and broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology* **15**, (2018).
26. Pedro, K. D., Henderson, A. J. & Agosto, L. M. Mechanisms of HIV-1 cell-to-cell transmission and the establishment of the latent reservoir. *Virus Research* **265**, 115-121 (2019).
27. Bracq, L., Xie, M., Benichou, S. & Bouchet, J. Mechanisms for cell-to-cell transmission of HIV-1. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
28. An, P. & Winkler, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene

- discovery. *Trends Genet.* **26**, 119-131 (2010).
29. O'Connor, T. G., Moynihan, J. A. & Caserta, M. T. Annual research review: The neuroinflammation hypothesis for stress and psychopathology in children - Developmental psychoneuroimmunology. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* **55**, 615-631 (2014).
 30. Stebbing, J. *et al.* A prognostic index for AIDS-associated Kaposi's sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy. *Lancet* **367**, 1495-1502 (2006).
 31. Harrington, W. J., Wood, C. & Wood, C. AIDS and associated malignancies. *en DNA Tumor Viruses* 683-702 (Springer US, 2009). doi:10.1007/978-0-387-68945-6_26
 32. Lu, D.-Y. *et al.* HAART in HIV/AIDS Treatments: Future Trends. *Infect. Disord. - Drug Targets* **18**, 15-22 (2017).
 33. Deruaz, M. *et al.* Protection of humanized mice from repeated intravaginal HIV challenge by passive immunization: A model for studying the efficacy of neutralizing antibodies in vivo. *J. Infect. Dis.* **214**, 612-616 (2016).
 34. Julg, B. *et al.* Protection against a mixed SHIV challenge by a broadly neutralizing antibody cocktail. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
 35. Shingai, M. *et al.* Passive transfer of modest titers of potent and broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibodies block SHIV infection in macaques. *J. Exp. Med.* **211**, 2061-2074 (2014).
 36. Heyndrickx, L. *et al.* Selected HIV-1 Env trimeric formulations act as potent immunogens in a rabbit vaccination model. *PLoS One* **8**, (2013).
 37. Seabright, G. E., Doores, K. J., Burton, D. R. & Crispin, M. Protein and Glycan Mimicry in HIV Vaccine Design. *Journal of Molecular Biology* **431**, 2223-2247 (2019).
 38. Doores, K. J., Fulton, Z., Huber, M., Wilson, I. A. & Burton, D. R. Antibody 2G12 Recognizes Di-Mannose Equivalently in Domain- and Nondomain-Exchanged Forms but Only Binds the HIV-1 Glycan Shield if Domain Exchanged. *J. Virol.* **84**, 10690-10699 (2010).
 39. Buchbinder, S. P. *et al.* Immunogenicity of a novel Clade B HIV-1 vaccine combination: Results of phase 1 randomized placebo controlled trial of an HIV-1 GM-CSF-expressing DNA prime with a modified vaccinia Ankara vaccine boost in healthy HIV-1 uninfected adults. *PLoS One* **12**, (2017).
 40. Bekker, L. G. *et al.* Subtype C ALVAC-HIV and bivalent subtype C gp120/MF59

- HIV-1 vaccine in low-risk, HIV-uninfected, South African adults: a phase 1/2 trial. *Lancet HIV* **5**, e366-e378 (2018).
41. Sanou, M. P., De Groot, A. S., Murphey-Corb, M., Levy, J. A. & Yamamoto, J. K. *HIV-1 Vaccine Trials: Evolving Concepts and Designs. The Open AIDS Journal* **6**, (2012).
 42. Kim, Y., Anderson, J. L. & Lewin, S. R. Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host and Microbe* **23**, 14-26 (2018).
 43. Debyser, Z., Vansant, G., Bruggemans, A., Janssens, J. & Christ, F. Insight in HIV integration site selection provides a block-and-lock strategy for a functional cure of HIV infection. *Viruses* **11**, (2019).
 44. Klasse, P. J. The molecular basis of HIV entry. *Cell. Microbiol.* **14**, 1183-1192 (2012).
 45. Falkenhagen, A. & Joshi, S. HIV Entry and Its Inhibition by Bifunctional Antiviral Proteins. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **13**, 347-364 (2018).
 46. Jin, Q., Marsh, J., Cornetta, K. & Alkhatib, G. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) generated by lentivirus vector-mediated delivery of the CCR5 Δ 32 gene despite detectable expression of the HIV-1 co-receptors. *J. Gen. Virol.* **89**, 2611-2621 (2008).
 47. Caffrey, M. Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: Insight into the intermolecular interactions of the gp41 loop. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1536**, 116-122 (2001).
 48. Liu, D. *et al.* Six-helix bundle completion in the distal C-terminal heptad repeat region of gp41 is required for efficient human immunodeficiency virus type 1 infection. *Retrovirology* **15**, 1-11 (2018).
 49. Liu, S. *et al.* Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J. Biol. Chem.* **280**, 11259-11273 (2005).
 50. Bewley, C. A., Louis, J. M., Ghirlando, R. & Marius Clore, G. Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41. *J. Biol. Chem.* **277**, 14238-14245 (2002).
 51. Su, S. *et al.* A novel HIV-1 gp41 tripartite model for rational design of HIV-1 fusion inhibitors with improved antiviral activity. *AIDS* **31**, 885-894 (2017).
 52. Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A. & Sattentau, Q. J. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science (80-.).* **250**, 1139 LP

- 1142 (1990).
53. Foy, K. & Juethner, S. N. Enfuvirtide (T-20): Potentials and Challenges. *J. Assoc. Nurses AIDS Care* **15**, 65-71 (2004).
 54. Westby, M. & Van Der Ryst, E. Review CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antivir. Chemistry Chemother.* **16**, 339-354 (2005).
 55. Molinos-Albert, L. M., Clotet, B., Blanco, J. & Carrillo, J. Immunologic insights on the membrane proximal external region: A major human immunodeficiency virus type-1 vaccine target. *Front. Immunol.* **8**, 1-12 (2017).
 56. He, Y. *et al.* Design and evaluation of sifuvirtide, a novel HIV-1 fusion inhibitor. *J. Biol. Chem.* **283**, 11126-11134 (2008).
 57. Greenberg, M. L. & Cammack, N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 333-340 (2004).
 58. Mzoughi, O. *et al.* Trimeric heptad repeat synthetic peptides HR1 and HR2 efficiently inhibit HIV-1 entry. *Biosci. Rep.* **39**, BSR20192196 (2019).
 59. Root, M. J., Kay, M. S. & Kim, P. S. Protein Design of an HIV-1 Entry Inhibitor. *Science (80-.).* **291**, 884 LP - 888 (2001).
 60. Xu, W. *et al.* Revisiting the mechanism of enfuvirtide and designing an analog with improved fusion inhibitory activity by targeting triple sites in gp41. *AIDS* **33**, 1545-1555 (2019).
 61. Crespillo, S. *et al.* Single-chain protein mimetics of the N-terminal heptad-repeat region of gp41 with potential as anti-HIV-1 drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 18207-18212 (2014).
 62. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1751**, 119-139 (2005).
 63. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131-137 (1989).
 64. Turnbull, W. B. & Daranas, A. H. On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14859-14866 (2003).
 65. Velazquez-Campoy, Adrián., *et al.* Isothermal Titration Calorimetry Supplement 23. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **17.8**, 1-24 (2004).
 66. Sigurskjold, B. W. Exact analysis of competition ligand binding by displacement

- isothermal titration calorimetry. *Anal. Biochem.* **277**, 260-266 (2000).
67. Montefiori, D. C. Evaluating Neutralizing Antibodies Against HIV, SIV, and SHIV in Luciferase Reporter Gene Assays. *Curr. Protoc. Immunol.* 1-17 (2005). doi:10.1002/0471142735.im1211s64
 68. Dwyer, J. J. *et al.* Design of an engineered N-terminal HIV-1 gp41 trimer with enhanced stability and potency. *Protein Sci.* **17**, 633-643 (2008).
 69. Lu, J. *et al.* Rapid emergence of enfuvirtide resistance in HIV-1-infected patients: Results of a clonal analysis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **43**, 60-64 (2006).
 70. Luo, P. & Baldwin, R. L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* **36**, 8413-8421 (1997).
 71. Chan, D. C. & Kim, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684 (1998).
 72. Peisajovich, S. G., Blank, L., Epanand, R. F., Epanand, R. M. & Shai, Y. On the interaction between gp41 and membranes: The immunodominant loop stabilizes gp41 helical hairpin conformation. *J. Mol. Biol.* **326**, 1489-1501 (2003).
 73. Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430 (1997).
 74. DeCamp, A. *et al.* Global Panel of HIV-1 Env Reference Strains for Standardized Assessments of Vaccine-Elicited Neutralizing Antibodies. *J. Virol.* **88**, 2489 LP - 2507 (2014).
 75. Sharma, S. K. *et al.* Cleavage-independent HIV-1 Env trimers engineered as soluble native spike mimetics for vaccine design. *Cell Rep* **11**, 539-550 (2015).
 76. Steger, H. K. & Root, M. J. Kinetic dependence to HIV-1 entry inhibition. *J. Biol. Chem.* **281**, 25813-25821 (2006).
 77. He, Y. *et al.* Conserved residue Lys574 in the cavity of HIV-1 Gp41 coiled-coil domain is critical for six-helix bundle stability and virus entry. *J. Biol. Chem.* **282**, 25631-25639 (2007).
 78. Leung, M. Y. K. & Cohen, F. S. Increasing hydrophobicity of residues in an anti-HIV-1 Env peptide synergistically improves potency. *Biophys. J.* **100**, 1960-1968 (2011).
 79. Deng, Y., Zheng, Q., Ketas, T. J., Moore, J. P. & Lu, M. Protein design of a bacterially expressed HIV-1 gp41 fusion inhibitor. *Biochemistry* **46**, 4360-4369 (2007).
 80. Sia, S. K., Carr, P. A., Cochran, A. G., Malashkevich, V. N. & Kim, P. S. Short

- constrained peptides that inhibit HIV-1 entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14664 LP - 14669 (2002).
81. Cole, J. L. & Garsky, V. M. Thermodynamics of peptide inhibitor binding to hiv-1 gp41. *Biochemistry* **40**, 5633-5641 (2001).
 82. Xu, L. *et al.* Emergence and Evolution of Enfuvirtide Resistance following Long-Term Therapy Involves Heptad Repeat 2 Mutations within gp41. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1113 LP - 1119 (2005).
 83. Mink, M. *et al.* Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Amino Acid Substitutions Selected during Enfuvirtide Treatment on gp41 Binding and Antiviral Potency of Enfuvirtide In Vitro. *J. Virol.* **79**, 12447 LP - 12454 (2005).
 84. Eggink, D. *et al.* Detailed Mechanistic Insights into HIV-1 Sensitivity to Three Generations of Fusion Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **284**, 26941-26950 (2009).
 85. Armand-Ugón, M., Gutiérrez, A., Clotet, B. & Esté, J. A. HIV-1 resistance to the gp41-dependent fusion inhibitor C-34. *Antiviral Res.* **59**, 137-142 (2003).
 86. McGillick, B. E., Balias, T. E., Mukherjee, S. & Rizzo, R. C. Origins of resistance to the HIVgp41 viral entry inhibitor T20. *Biochemistry* **49**, 3575-3592 (2010).
 87. Lu, Y., Yang, C. Y. & Wang, S. Binding free energy contributions of interfacial waters in HIV-1 protease/inhibitor complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11830-11839 (2006).
 88. Palencia, A., Camara-Artigas, A., Pisabarro, M. T., Martinez, J. C. & Luque, I. Role of Interfacial Water Molecules in Proline-rich Ligand Recognition by the Src Homology 3 Domain of Abl. *J. Biol. Chem.* **285**, 2823-2833 (2010).
 89. Root, M. J. & Hamer, D. H. Targeting therapeutics to an exposed and conserved binding element of the HIV-1 fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 5016 LP - 5021 (2003).
 90. Lee, J. H., Ozorowski, G. & Ward, A. B. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science (80-.).* **351**, 1043 LP - 1048 (2016).
 91. Pancera, M. *et al.* Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env. *Nature* **514**, 455 (2014).
 92. Munro, J. B. *et al.* Conformational dynamics of single HIV-1 envelope trimers on the surface of native virions. *Science (80-.).* **346**, 759 LP - 763 (2014).
 93. Ma, X. *et al.* HIV-1 Env trimer opens through an asymmetric intermediate in which individual protomers adopt distinct conformations. *Elife* **7**, e34271 (2018).

94. Ruprecht, C. R. *et al.* MPER-specific antibodies induce gp120 shedding and irreversibly neutralize HIV-1. *J. Exp. Med.* **208**, 439 LP - 454 (2011).
95. Chu, S. & Gochin, M. Identification of fragments targeting an alternative pocket on HIV-1 gp41 by NMR screening and similarity searching. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **23**, 5114-5118 (2013).
96. Chu, S. *et al.* Swapped-Domain Constructs of the Glycoprotein-41 Ectodomain Are Potent Inhibitors of HIV Infection. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1247-1257 (2015).
97. Jurado, S. *et al.* Structural and Thermodynamic Analysis of HIV-1 Fusion Inhibition Using Small gp41 Mimetic Proteins. *J. Mol. Biol.* **431**, (2019).
98. Qiu, Z. *et al.* Identification and characterization of a subpocket on the N-trimer of HIV-1 Gp41: Implication for viral entry and drug target. *Aids* **29**, 1015-1024 (2015).
99. Lupas, B. A. N. & Gruber, M. THE STRUCTURE OF α -HELICAL COILED COILS -Helical coiled coils are versatile protein domains , supporting a I . Historical Introduction The first investigations into the structure of coiled coils were made by William Astbury at the University of Leeds in t. *Adv. Protein Chem.* **70**, 37-78 (2005).
100. Suntok, T. R. & Chan, D. C. The fusion activity of HIV-1 gp41 depends on interhelical interactions. *J. Biol. Chem.* **280**, 19852-19857 (2005).
101. Lu, M. *et al.* Structural and Functional Analysis of Interhelical Interactions in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Envelope Glycoprotein by Alanine-Scanning Mutagenesis. *J. Virol.* **75**, 11146-11156 (2001).
102. Wang, X. *et al.* The Conserved Residue Arg46 in the N-Terminal Heptad Repeat Domain of HIV-1 gp41 Is Critical for Viral Fusion and Entry. *PLoS One* **7**, (2012).
103. Zheng, B. *et al.* Hydrophobic mutations in buried polar residues enhance HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat-C-terminal heptad repeat interactions and C-peptides' anti-HIV activity. *Aids* **28**, 1251-1260 (2014).
104. Wang, S. *et al.* Interhelical interactions in the gp41 core: Implications for activation of HIV-1 membrane fusion. *Biochemistry* **41**, 7283-7292 (2002).
105. Wang, Y., Lu, H., Zhu, Q., Jiang, S. & Liao, Y. Structure-based design, synthesis and biological evaluation of new N-carboxyphenylpyrrole derivatives as HIV fusion inhibitors targeting gp41. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 189-192 (2010).
106. Debnath, A. K., Radigan, L. & Jiang, S. Structure-based identification of small molecule antiviral compounds targeted to the gp41 core structure of the human

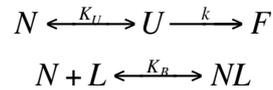
- immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Chem.* **42**, 3203-3209 (1999).
107. Jiang, S. *et al.* N-Substituted Pyrrole Derivatives as Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors That Interfere with the gp41 Six-Helix Bundle Formation and Block Virus Fusion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4349 LP - 4359 (2004).
 108. Chong, H. *et al.* Discovery of critical residues for viral entry and inhibition through structural insight of HIV-1 fusion inhibitor CP621-652. *J. Biol. Chem.* **287**, 20281-20289 (2012).
 109. Geng, X. *et al.* Conserved residue Asn-145 in the C-terminal heptad repeat region of HIV-1 gp41 is critical for viral fusion and regulates the antiviral activity of fusion inhibitors. *Viruses* **11**, 1-21 (2019).
 110. Zhu, Y., Ding, X., Yu, D., Chong, H. & He, Y. The Tryptophan-Rich Motif of HIV-1 Gp41 Can Interact with the N-Terminal Deep Pocket Site: New Insights into the Structure and Function of Gp41 and Its Inhibitors. *J. Virol.* JVI.01358-19 (2019). doi:10.1128/JVI.01358-19
 111. Johnson, L. M., Horne, W. S. & Gellman, S. H. Broad distribution of energetically important contacts across an extended protein interface. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10038-10041 (2011).
 112. Motlagh, H. N., Wrabl, J. O., Li, J. & Hilser, V. J. The ensemble nature of allostery. *Nature* **508**, 331 (2014).
 113. Liu, S. *et al.* HIV gp41 C-terminal heptad repeat contains multifunctional domains: Relation to mechanisms of action of anti-HIV peptides. *J. Biol. Chem.* **282**, 9612-9620 (2007).
 114. Yu, X. *et al.* Mutations of Gln64 in the HIV-1 gp41 N-Terminal Heptad Repeat Render Viruses Resistant to Peptide HIV Fusion Inhibitors Targeting the gp41 Pocket. *J. Virol.* **86**, 589-593 (2012).
 115. Lu, L. *et al.* HIV-1 variants with a single-point mutation in the gp41 pocket region exhibiting different susceptibility to HIV fusion inhibitors with pocket- or membrane-binding domain. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 2950-2957 (2012).
 116. Root, Michael J, Michael S. Kay, P. S. K. Protein Design of an HIV-1 Entry Inhibitor. *Science* **291**, 884-888 (2001).
 117. Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* **8**, 409-427 (2016).

118. Tu, T. *et al.* Improvement in thermostability of an *Achaetomium* sp. strain Xz8 endopolygalacturonase via the optimization of charge-charge interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 6938-6944 (2015).
119. Zhang, L., Chou, C. P. & Moo-Young, M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by *Escherichia coli* expression system. *Biotechnol. Adv.* **29**, 923-929 (2011).
120. Matsumura, M., Signor, G. & Matthews, B. W. Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature* **342**, 291-293 (1989).
121. Hwa, K. Y., Subramani, B., Shen, S. T. & Lee, Y. M. An intermolecular disulfide bond is required for thermostability and thermoactivity of β -glycosidase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 7825-7836 (2014).
122. Cohen, I. *et al.* Disulfide engineering of human Kunitz-type serine protease inhibitors enhances proteolytic stability and target affinity toward mesotrypsin. *J. Biol. Chem.* **294**, 5105-5120 (2019).
123. Sanders, R. W. & Moore, J. P. Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design. *Immunol. Rev.* **275**, 161-182 (2017).
124. Kahle, K. M., Steger, H. K. & Root, M. J. Asymmetric deactivation of HIV-1 gp41 following fusion inhibitor binding. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).

ANEXOS

Modelo de ajuste de los datos de DSC

Modelo Lumry-Eyring de desnaturalización de una proteína acoplado al equilibrio de unión proteína-péptido. El modelo se describe según el siguiente esquema:



En este modelo, NL representa el complejo entre proteína nativa (N), y péptido (L). U y F representan el estado desplegado y el estado final desnaturalizado irreversiblemente, respectivamente. La constante k es una constante de velocidad de primer orden para la desnaturalización irreversible. La constante de unión del ligando K_B , y la constante de desplegamiento reversible de la proteína, K_U , están definidas como:

$$K_B = \frac{[NL]}{[N][L]} \quad K_U = \frac{[U]}{[N]}$$

Usando el estado nativo como estado de referencia de la proteína, el equilibrio de unión y desplegamiento puede ser relacionado usando la siguiente función de partición:

$$Q = \frac{[N] + [U] + [NL]}{[N]} = 1 + K_U + K_B[L]$$

A partir de la concentración total, C_0 , definimos la concentración de la proteína en cualquier estado del equilibrio exceptuando la proteína desnaturalizada irreversiblemente, como:

$$C_{eq} = C_0(1 - x_F)$$

donde x_F es la fracción molar de proteína desnaturalizada irreversiblemente, F. Usando la función de partición definida arriba, las fracciones y de proteína no desnaturalizada en cada estado de equilibrio pueden calcularse como:

$$y_N = \frac{1}{Q} \quad y_U = \frac{K_U}{Q} \quad y_{NL} = \frac{K_B[L]}{Q}$$

Podemos relacionar la fracción molar de cada estado en relación con la proteína no desnaturalizada, con las fracciones relativas a la proteína total a través de:

$$x_N = y_N(1 - x_F) \quad x_U = y_U(1 - x_F) \quad x_{NL} = y_{NL}(1 - x_F)$$

La concentración total de ligando es:

$$L_0 = [L] + [NL] = [L] \left(1 + \frac{K_B C_{eq}}{Q} \right)$$

Sustituyendo Q y resolviendo [L]:

$$[L] = \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}$$

Donde: $A = K_B$ $B = K_B(C_{eq} - L_0) + K_U + 1$ $C = -L_0(1 + K_U)$

Ya que en un barrido de DSC todas estas funciones cambian con la temperatura, podemos tomar las derivadas con respecto a la temperatura:

$$\frac{dA}{dT} = \frac{dK_B}{dT} = K_B \frac{\Delta H_B}{RT^2}$$

$$\frac{dB}{dT} = \frac{dK_B}{dT}(C_{eq} - L_0) + \frac{dK_U}{dT} + K_B \frac{dC_{eq}}{dT} = K_B \frac{\Delta H_B}{RT^2}(C_{eq} - L_0) + K_U \frac{\Delta H_U}{RT^2} - K_B C_0 \frac{dx_F}{dT}$$

$$\frac{dC}{dT} = -L_0 \frac{dK_U}{dT} = -L_0 K_U \frac{\Delta H_U}{RT^2}$$

$$\frac{dQ}{dT} = K_U \frac{\Delta H_U}{RT^2} + K_B [L] \frac{\Delta H_B}{RT^2} + K_B \frac{d[L]}{dT}$$

$$\frac{d[L]}{dT} = \frac{\left[-\frac{dB}{dT} + \frac{1}{2}(B^2 - 4AC)^{-1/2} \left(2B \frac{dB}{dT} - 4C \frac{dA}{dT} - 4A \frac{dC}{dT} \right) \right]}{2A} - \frac{dA}{dT} \frac{[-B + (B^2 - 4AC)^{1/2}]}{2A^2}$$

$$\frac{dy_U}{dT} = \frac{1}{Q} \frac{dK_U}{dT} - \frac{dQ}{dT} \frac{K_U}{Q^2} = \frac{K_U}{Q} \frac{\Delta H_U}{RT^2} - \frac{dQ}{dT} \frac{K_U}{Q^2}$$

$$\frac{dy_{NL}}{dT} = \frac{1}{Q} \left(\frac{dK_B}{dT} [L] + K_B \frac{d[L]}{dT} \right) - \frac{K_B [L]}{Q^2} \frac{dQ}{dT} = \frac{1}{Q} \left(K_B \frac{\Delta H_B}{RT^2} [L] + K_B \frac{d[L]}{dT} \right) - \frac{K_B [L]}{Q^2} \frac{dQ}{dT}$$

$$\frac{dy_N}{dT} = -\frac{dy_U}{dT} - \frac{dy_{NL}}{dT}$$

Ahora, obtenemos la función de entalpía media de todo el sistema:

$$\langle H \rangle = H_N[N] + H_{NL}[NL] + H_U[U] + H_L[L] + H_F[F]$$

Y usando el estado nativo de la proteína N, y el ligando libre, L, como estados de referencia, su entalpía media es:

$$\langle H \rangle_{ref} = H_N C_0 + H_L L_0$$

Por lo tanto, en cualquier condición experimental, la entalpía de exceso viene dada por:

$$\begin{aligned} \langle \Delta H \rangle &= H_N([N] - C_0) + H_U[U] + H_{NL}[NL] + H_L([L] - L_0) + H_F[F] \\ &= (H_U - H_N)[U] + (H_{NL} - H_N - H_L)[NL] + (H_F - H_N)[F] \\ &= \Delta H_U[U] + \Delta H_B[NL] + \Delta H_F[F] \end{aligned}$$

Donde los incrementos de entalpía para cada estado relativos a la referencia son definidos por los paréntesis en la ecuación intermedia.

Dividiendo por la concentración total de proteína:

$$\begin{aligned} \langle \Delta H \rangle &= \Delta H_U x_U + \Delta H_B x_{NL} + \Delta H_F x_F \\ &= \Delta H_U y_U (1 - x_F) + \Delta H_B y_{NL} (1 - x_F) + \Delta H_F x_F \\ &= \Delta H^{eq} + (\Delta H_F - \Delta H^{eq}) x_F \end{aligned}$$

Aquí ΔH^{eq} representa la función de entalpía de exceso en el caso que la desnaturalización irreversible no ocurra. Tomando la derivada con respecto a la temperatura de la función entalpía de exceso, obtenemos la capacidad calorífica de exceso del sistema:

$$\begin{aligned} \Delta C_p &= \frac{d\langle H \rangle}{dT} = \Delta C_{pU} x_U + \Delta H_U \frac{dx_U}{dT} + \Delta C_{pB} x_{NL} + \Delta H_B \frac{dx_{NL}}{dT} + \Delta C_{pF} x_F + \Delta H_F \frac{dx_F}{dT} \\ &= \Delta C_{pU} y_U (1 - x_F) + \Delta H_U \frac{dy_U}{dT} (1 - x_F) - \Delta H_U y_U \frac{dx_F}{dT} + \Delta C_{pB} y_{NL} (1 - x_F) \\ &\quad + \Delta H_B \frac{dy_{NL}}{dT} (1 - x_F) - \Delta H_B y_{NL} \frac{dx_F}{dT} + \Delta C_{pF} x_F + \Delta H_F \frac{dx_F}{dT} \end{aligned}$$

Que puede ser agrupada como:

$$\begin{aligned}
\Delta C_p &= \Delta C_{pU} y_U + \Delta H_U \frac{dy_U}{dT} + \Delta C_{pB} y_{nL} + \Delta H_B \frac{dy_{nL}}{dT} \\
&\left(+\Delta C_{pF} - \Delta C_{pU} y_U - \Delta C_{pB} y_{nL} - \Delta H_B \frac{dy_{nL}}{dT} - \Delta H_U \frac{dy_U}{dT} \right) x_F \\
&\quad + \left(\Delta H_F - \Delta H_U y_U - \Delta H_B y_{nL} \right) \frac{dx_F}{dT} \\
&= \Delta C_p^{eq} + \left(\Delta C_{pF} - \Delta C_p^{eq} \right) x_F + \left(\Delta H_F - \Delta H^{eq} \right) \frac{dx_F}{dT}
\end{aligned}$$

De nuevo, ΔC_p^{eq} , representa el exceso de capacidad calorífica en ausencia de desnaturalización irreversible. La influencia de la desnaturalización irreversible en los termogramas de DSC está relacionada con la velocidad de producción de F, durante el barrido de DSC. Para obtener x_F y su derivada con la temperatura necesitamos integrar la ecuación de velocidad correspondiente:

$$\frac{dx_F}{dT} = \frac{k}{v} x_U = \frac{k}{v} y_U (1 - x_F)$$

En esta ecuación, k es la constante para la desnaturalización irreversible del estado desplegado y v es la velocidad de barrido constante (en $K \text{ min}^{-1}$) en el experimento de DSC. Para simplificar, asumimos un proceso de primer orden para el proceso de desnaturalización. La constante k cambia con la temperatura acorde con la dependencia de Arrhenius:

$$k = k^* e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right)}$$

Donde E_a es la energía de activación y k^* y T^* son valores de referencia (tomados a la temperatura donde $k = 1 \text{ min}^{-1}$). Esta ecuación no puede ser integrada de manera analítica, necesita una integración numérica para cada temperatura usando los puntos de temperatura previos. Usamos el algoritmo Runge-Kutta empleando pasos de integración adaptativos, implementados en una función de ajuste en el software Origin (Originlab).

Finalmente, necesitamos definir las dependencias con la temperatura de la entalpía, entropía y energía de Gibbs para cada estado, y a partir de estos, la dependencia con la temperatura de las constantes de equilibrio. Para simplificar, asumimos como constantes los cambios en la capacidad calorífica de unión y desplegamiento, y para reducir el número de parámetros de ajuste, asumimos la misma capacidad calorífica para los estados U y F.

Con estas simplificaciones, para el proceso de desplegamiento:

$$\begin{aligned}\Delta H_U &= \Delta H_F = \Delta H_U(T_U) + \Delta C_{pU,0} \cdot (T - T_U) \\ \Delta S_U &= \frac{\Delta H_U(T_U)}{T_U} + \Delta C_{pU,0} \ln \frac{T}{T_U} \\ \Delta G_U &= \Delta H_U - T \cdot \Delta S_U \\ K_U &= e^{-\frac{\Delta G_U}{RT}}\end{aligned}$$

En estas funciones, T_U está definida como la temperatura de desplegamiento, donde $\Delta G_U = 0$.

Y para el proceso de unión:

$$\begin{aligned}\Delta H_B &= \Delta H_B(T_0) + \Delta C_{pB,0} \cdot (T - T_0) \\ \ln K_B &= \ln K_B(T_0) - \frac{\Delta H_B(T_0) - \Delta C_{pB,0} \cdot T_0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_{pB,0}}{R} \ln \frac{T}{T_0}\end{aligned}$$

Aquí por conveniencia, usamos T_0 como la temperatura de referencia para la constante de unión $K_B(T_0)$.

Finalmente, los termogramas de DSC medidos experimentalmente consisten en la capacidad calorífica de la mezcla proteína-péptido, relativa a la línea base del tampón y normalizada por mol de proteína. Este termograma contiene la contribución de capacidad calorífica del volumen de agua desplazado por la proteína y ligando:

$$\Delta C_{p,ap} = \left(C_p(N) - \frac{v_{pr} M_{pr}}{v_{H_2O}} c_p(H_2O) \right) + \left(C_p(L) - \frac{v_L M_L}{v_{H_2O}} c_p(H_2O) \right) \frac{L_0}{C_0} + \Delta C_p$$

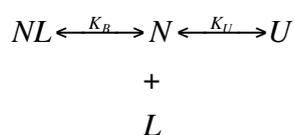
Aquí, $C_p(N)$ y $C_p(L)$ son las funciones de capacidad calorífica molar parcial del estado nativo de la proteína y del ligando libre, v_{pr} , v_L y v_{H_2O} son los volúmenes específicos de la proteína el ligando y del agua, respectivamente, y M_{pr} y M_L son las masas molares de la proteína y del ligando. El segundo término de esta ecuación es equivalente al termograma de DSC del péptido medido con la misma concentración del ligando libre, L_0 , normalizado por la concentración de proteína, C_0 . Podemos medir experimentalmente y sustraer esta función y corregir la capacidad calorífica del agua desplazada por la proteína usando un volumen específico constante de $0.73 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ para la proteína. Finalmente, el termograma corregido viene dado por:

$$C_p^* = C_p(N) + \Delta C_p$$

En esta ecuación, $C_p(N)$ es considerado una función lineal ajustable de la temperatura. Y las ecuaciones fueron implementadas en una herramienta de modelo de ajuste no-lineal en Origin (Originlab; Northampton, MA).

Modelo de ajuste de los experimentos de desplegamiento térmico mediante CD

El modelo consiste en un modelo de desplegamiento de dos estados acoplado a la interacción proteína-péptido, como se muestra en el siguiente esquema:



Este modelo equivale al modelo anterior, pero suponiendo ausencia de desnaturalización irreversible. Todas las ecuaciones relativas a las magnitudes termodinámicas de los estados de equilibrio y su variación con la temperatura son idénticas a las ya descritas en el modelo anterior.

Para describir el progreso de la elipticidad de la muestra durante el barrido de temperatura obtenido por CD, se suponen funciones lineales que definen cada señal de CD para cada estado, en función de la temperatura:

Estado Nativo (N):	$S_N = S_{N0} + S_{N1} \cdot t$	(t en °C):
Estado desplegado (U):	$S_U = S_{U0} + S_{U1} \cdot t$	
Complejo proteína-ligando (NL):	$S_{NL} = S_{NL0} + S_{NL1} \cdot t$	
Ligando Libre (L):	$S_L = S_{L0} + S_{L1} \cdot t$	

Así pues, la señal obtenida por CD es dada por:

$$S = S_N \cdot x_N + S_U \cdot x_U + S_{NL} \cdot x_{NL} + S_L \cdot \frac{[L]}{C_0} \quad (\text{S está expresada en } \text{deg} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^2)$$

La señal global de CD es la suma de las señales de cada estado, multiplicadas por la fracción molar de cada estado. De esta función se podría estimar la constante de equilibrio de unión, las entalpías de unión y de desplegamiento, y la temperatura de desplegamiento, T_U , realizando experimentos de desplegamiento en ausencia y en presencia de varias concentraciones de ligando. El modelo se implementó en la herramienta de ajuste no-lineal de Origin (Originlab; Northampton, MA).