

Universidad de Barcelona  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Fisicoquímica

Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona  
Departamento de Química de Péptidos y Proteínas

Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer  
Hospital Clínico de Barcelona  
Servicio de Inmunología

Programa de doctorado "Medicaments, alimentació i salut"  
Bienio: 2000-2002

# **Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Teresa Pérez Escoda para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores:

Dra. Isabel Haro Villar  
Investigador Científico  
Dept. Química de Péptidos y Proteínas  
IIQAB - CSIC

Dra. Guadalupe Ercilla González  
Consultor  
Servicio de Inmunología  
IDIBAPS - Hospital Clínico

Tutor:

Dra. Montserrat Muñoz  
Profesora asociada  
Departamento de Fisicoquímica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

M<sup>a</sup> Teresa Pérez Escoda  
Barcelona, marzo 2007

## **CAPÍTULO 3**

**Estudios conformacionales de las construcciones sintéticas. Dicroísmo circular y espectroscopia de infrarrojo**



Los resultados obtenidos después de realizar los estudios inmunológicos discutidos en el capítulo 2 mostraron un diferente comportamiento en el reconocimiento de los anticuerpos por parte de los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126) en comparación con sus correspondientes construcciones quiméricas, Qm1 y Qm2. De forma similar, las moléculas cíclicas, cyc-HT y cyc-CT, también mostraron una mayor sensibilidad frente a los anticuerpos al compararlas con su homólogo lineal. Este diferente comportamiento, podrían ser debidos a una diferente organización de las moléculas a nivel de su estructura secundaria. En este capítulo se muestran y discuten los resultados obtenidos tras realizar un estudio conformacional comparativo de las moléculas citadas con la finalidad de analizar si el diferente comportamiento frente a los anticuerpos es debido a diferencias en la estructura secundaria de estas moléculas.

Para llevar a cabo el análisis conformacional se emplearon las técnicas de dicroísmo circular y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

### 3.1 Dicroísmo circular

El Dicroísmo Circular (CD, del inglés *circular dichroism*) es una técnica espectroscópica no destructiva destinada al análisis conformacional de sustancias ópticamente activas. El CD mide la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente hacia la derecha y hacia la izquierda. El CD es una de las técnicas más sensibles para la determinación de la conformación y la monitorización de cambios estructurales de biomoléculas.

La luz polarizada circularmente es quiral y se puede considerar formada por dos componentes que son imágenes especulares una de la otra y que pueden ser diferenciadas por moléculas quirales. Esta interacción puede detectarse de dos maneras: por una diferencia en la velocidad de los dos haces de luz a través de la muestra (dispersión óptica rotatoria) o bien por la diferente absorción de cada haz por parte de la muestra (dicroísmo circular).

A pesar de que se trata de un método empírico, permite interpretar directamente los cambios en la estructura secundaria de un péptido o una proteína. El espectro de CD del ultravioleta lejano de proteínas es extremadamente sensible a la estructura de la proteína, mientras que el espectro del ultravioleta cercano refleja las contribuciones de las cadenas laterales aromáticas, puentes disulfuro y las bandas de CD inducidas por grupos prostéticos. Todas estas medidas proporcionan información acerca de la estructura global de una molécula proteica así como su conformación local alrededor de los grupos aromáticos y las uniones disulfuro. La facilidad del análisis y la poca cantidad de producto que se requiere, convierte al CD en una técnica ampliamente utilizada. No obstante, y a diferencia de las técnicas de difracción de rayos X de cristales de proteínas y resonancia magnética nuclear para soluciones proteicas, no permite la determinación de la estructura tridimensional de una proteína.

### 3.1.1 Expresión del dicroísmo circular

Las medidas de CD se realizan determinando la diferencia de absorbancias entre la luz polarizada circularmente hacia la derecha ( $A_D$ ) y hacia la izquierda ( $A_I$ ). Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, que define el proceso de transición electrónica en la espectroscopia UV-visible, se puede expresar esta diferencia de absorbancias como:

$$\Delta A = A_I - A_D = (\epsilon_I c l) - (\epsilon_D c l) \quad (1)$$

donde  $c$  es la concentración molar del soluto quiral,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar y  $l$  el paso de luz; por lo que se puede decir que

$$\Delta \epsilon = \epsilon_I - \epsilon_D \quad (2)$$

y por tanto:

$$\Delta A = \Delta \epsilon c l \quad (3)$$

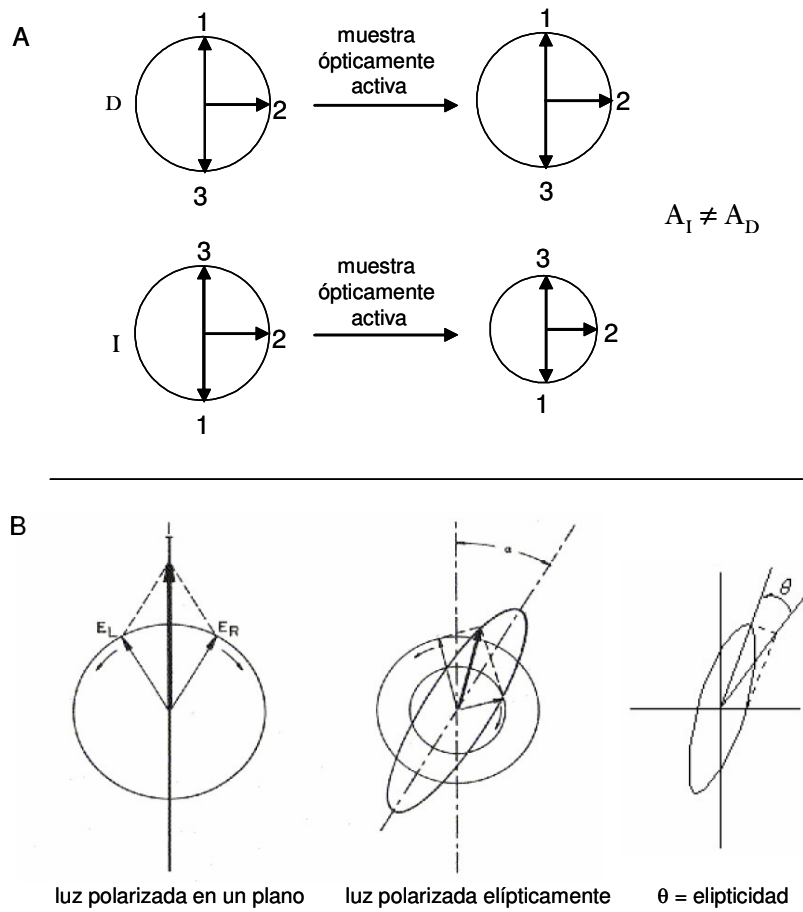
Cuando la luz polarizada atraviesa un medio quiral, los vectores eléctricos describen una elipse cuyo eje mayor se encuentra en un nuevo ángulo de rotación. Cuando los vectores eléctricos de las dos componentes circulares se encuentran en la misma dirección, la suma de sus magnitudes proporciona el eje semimayor de la elipse, y cuando están en direcciones opuestas, la diferencia de sus magnitudes proporciona el eje semimenor de la elipse. El CD se define mediante la relación entre el eje semimayor y semimenor. Esta relación es la tangente del ángulo  $\theta$ , conocido como elipticidad (Figura 3.1).

Debido a que este ángulo es generalmente más pequeño, la tangente de  $\theta$  es aproximadamente igual a  $\theta$  y se relaciona con la absorbancia mediante la siguiente expresión:

$$\theta \text{ (deg)} = 32.98 \cdot \Delta A \quad (4)$$

y por tanto, la expresión con  $\Delta \epsilon$  es la elipticidad molar que incluye un factor arbitrario de 100 y se expresa en elipticidad molar por residuo cuyas unidades son  $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1} \text{ residuo}^{-1}$ .

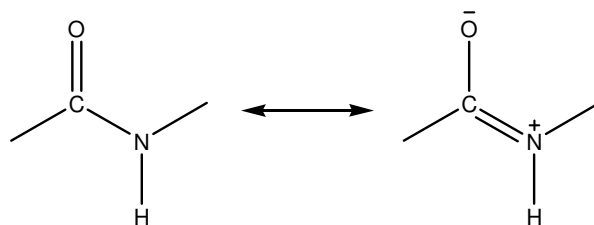
$$[\theta] = 3298 \cdot \Delta \epsilon \quad (5)$$



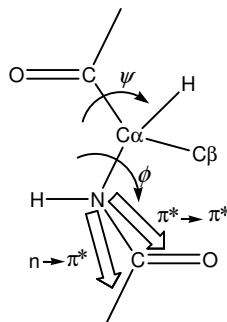
**Figura 3.1.** A) cuando la luz polarizada en un plano atraviesa una muestra ópticamente activa sus componentes de luz circularmente polarizada se absorben en distinta cantidad. B) La nueva recombinación produce luz elípticamente polarizada. La diferencia entre  $A_D$  y  $A_I$  es la señal de dicroísmo circular.

### 3.1.1.1 Espectros de CD de estructuras secundarias de proteínas

El CD es un fenómeno que resulta cuando los cromóforos en un entorno asimétrico interactúan con luz polarizada. En las proteínas y péptidos los cromóforos mayoritarios son los grupos amida de los enlaces peptídicos. Este grupo amida es plano ya que tiene carácter parcial de doble enlace debido a la deslocalización de un par de electrones no enlazados del átomo de nitrógeno. Por tanto, no es ópticamente activo por sí mismo, pero el entorno quiral en el que se encuentra hace que pueda ser detectable por CD.



Las estructuras peptídicas poseen regiones donde los grupos cromóforos se encuentran en disposición altamente ordenada, tales como las hélices  $\alpha$  o las regiones  $\beta$ . El enlace amida absorbe la luz en el UV lejano a una longitud de onda entre 185 y 250 nm y posee dos transiciones electrónicas: una transición  $n \rightarrow \pi^*$  a 220 nm y una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  a 190 nm. Por lo tanto, es de esperar que sea este cromóforo el que domine en el espectro de CD de una secuencia peptídica a longitudes de onda inferiores a 250 nm, si bien existen otros cromóforos como los aromáticos o los puentes disulfuro que también adsorben en esta zona.

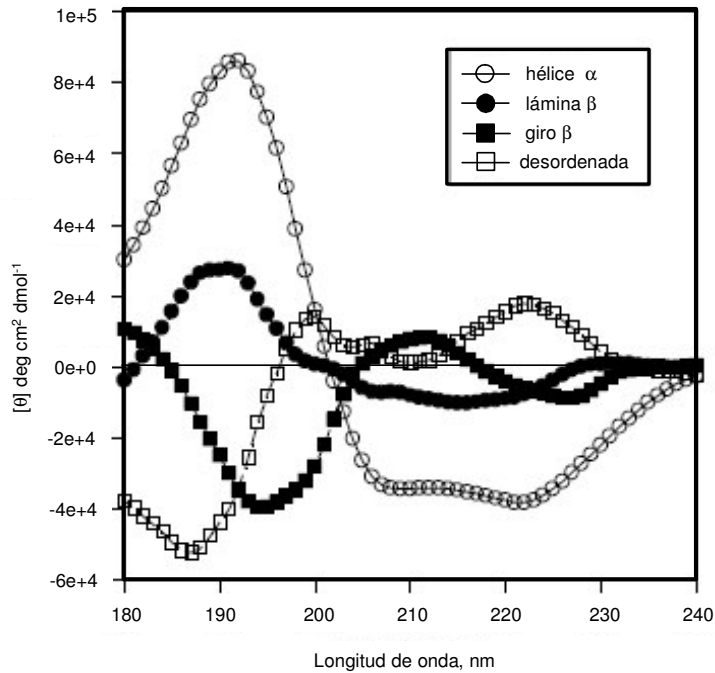


**Figura 3.2.** El cromóforo más importante en un péptido es el grupo amida del enlace peptídico, un carbono  $\alpha$  asimétrico entre dos grupos amida.

### 3.1.1.2 Estructura secundaria de péptidos y proteínas

Las diferentes estructuras secundarias que se encuentran en péptidos y proteínas se definen según los valores de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  del esqueleto polipeptídico (Figura 3.2).

Dependiendo de la ordenación de los enlaces peptídicos, las transiciones ópticas del enlace amida pueden dividirse en múltiples transiciones de distinta frecuencia e intensidad, y en consecuencia las estructuras secundarias formadas por enlaces peptídicos tienen espectros de CD característicos (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Espectro de dicroísmo circular en UV lejano de las principales conformaciones [156].

### Hélice $\alpha$

De todos los tipos de estructuras secundarias la hélice  $\alpha$  es la más común. Es la estructura observada con más frecuencia en las proteínas glomerulares. El espectro de una hélice  $\alpha$  presenta tres bandas características que corresponden a las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  (banda negativa a 220-222 nm),  $\pi \rightarrow \pi^*$  paralela (banda negativa a 207-209 nm) y  $\pi \rightarrow \pi^*$  perpendicular (banda positiva a 191-193 nm). La intensidad de estas tres bandas refleja la proporción de elipticidad en los péptidos analizados.

### Hélice $3_{10}$

La hélice  $3_{10}$  se denomina con este nombre debido a que contiene 3 restos por vuelta de hélice (en comparación de los 3.6 de una hélice  $\alpha$ ) y 10 átomos encerrados en el anillo. Son menos estables que las hélices  $\alpha$  y presentan un empaquetamiento azimutal, es decir, en una misma vertical, menos favorable que el empaquetamiento alternado que se observa en una hélice  $\alpha$  [157]. En el espectro de DC, la hélice  $3_{10}$  se caracteriza por presentar una intensidad de la banda correspondiente a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  mucho menor que la que presenta la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  paralela [158,159].



### Lámina $\beta$

El espectro muestra una banda negativa intensa sobre los 216 nm, una banda positiva entre 195 y 200 nm, y otra banda negativa alrededor de 175 nm. Estos espectros presentan mayor variabilidad que los de una hélice  $\alpha$ , tanto en la amplitud como en la posición de las bandas.

### Giro $\beta$

Las transiciones características de un Giro  $\beta$  son la  $n \rightarrow \pi^*$  que muestra una banda negativa débil a 220-230 nm y la  $\pi \rightarrow \pi^*$  que muestra una banda positiva a 200-210 nm y una banda negativa a 180-190 nm.

### Desordenada o *random coil*

El espectro típico de una estructura desordenada o *random coil* se caracteriza por una banda negativa intensa alrededor de 200 nm y otra banda muy débil, que puede ser positiva o negativa, sobre los 220-230 nm.

A pesar de estas bandas características para cada estructura secundaria, en la práctica es difícil interpretar con exactitud el espectro de CD de un péptido. En general, cuando en estas moléculas predomina con exactitud un único tipo de estructura secundaria, el espectro se puede considerar como el diagnóstico de la confirmación. Sin embargo, en estructuras más complejas, se hace necesario algún método que permita cuantificar el grado de estructuración y determinar la contribución cada una de las conformaciones en un espectro.

Una de las maneras de cuantificar el grado de estructuración es determinar el porcentaje de helicidad que presenta el péptido, utilizando los parámetros de Yang [160]. Estos parámetros predicen la elipticidad molar por residuo que debería tener un péptido de determinada longitud para que presentara un 100% de helicidad, tomando como base los espectros conocidos de diferentes proteínas.

$$[\theta_H^n] = [\theta_H^0] (1-k/n)$$

donde,  $[\theta_H^n]$  es la elipticidad molar por residuo que presentaría un péptido de n aminoácidos con una helicidad del 100%.  $[\theta_H^0]$  es la elipticidad molar por residuo que presentaría un péptido de longitud

infinita totalmente helicoidal.  $k$ , es una constante que depende de la longitud de onda.  $n$ , representa el número de enlaces amida que contiene el péptido.

Los datos estadísticos obtenidos a partir de un gran número de proteínas de estructura secundaria conocida permitieron a Yang proponer los valores de la Tabla 3.1 para los parámetros anteriores.

**Tabla 3.1.** Parámetros de Yang.

$\lambda$ (nm)	$[\theta_H^\alpha]$	$k$
190	82.3	2.48
207	-33.8	3.60
222	-39.5	2.57

Si se toma el valor de elipticidad molar experimental de un péptido (en una longitud de onda determinada) y se compara con el que correspondería a un 100% de helicidad según estos parámetros, se puede calcular el porcentaje de estructura helicoidal que contiene el péptido:

$$\% \text{ helicidad} = \frac{[\theta_{\text{exp}}]}{[\theta_H^n]} \times 100$$

Además del cálculo del porcentaje de helicidad, existen programas informáticos que permiten determinar, a partir de los datos experimentales de CD, la contribución específica de cada una de las estructuras básicas en la conformación global de la proteína [156]. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que todos estos programas de deconvolución están pensados para proteínas considerablemente grandes. Los programas informáticos de deconvolución de espectros utilizados para cuantificar los datos conformacionales en este trabajo fueron Contin y K2D.

El programa Contin se basa en la técnica de regresión de Provencher & Glöckner [161] quienes propusieron que el espectro de CD de proteínas no conocidas podría ajustarse directamente mediante una combinación lineal de espectros de una base de datos con numerosas proteínas de conformación conocida. El programa utiliza una variación del método de los mínimos cuadrados y proporciona una buena estimación de los giros  $\beta$ , no obstante, los ajustes que realiza este método

dependen de las proteínas utilizadas como estándares en la base de datos. Por ello algunos autores sugieren que se puede mejorar la estimación de la conformación incluyendo proteínas desnaturalizadas como referencia para la conformación desordenada en la base de datos.

El programa K2D es uno de los pocos programas de redes neuronales. Una red neuronal es un programa que permite detectar modelos y correlaciones en los datos. Böhm *et al.* [162] propusieron por primera vez la utilización de redes neuronales para analizar espectros de CD. El programa K2D permite determinar conformaciones de hélice  $\alpha$  y estructura  $\beta$ . Este programa sólo utiliza los datos obtenidos entre 200 y 240 nm y proporciona mejores estimaciones de lámina  $\beta$  [163] cuando dispone de datos con un limitado rango de longitud de onda, aunque debe tenerse en cuenta que no evalúa los giros  $\beta$ .

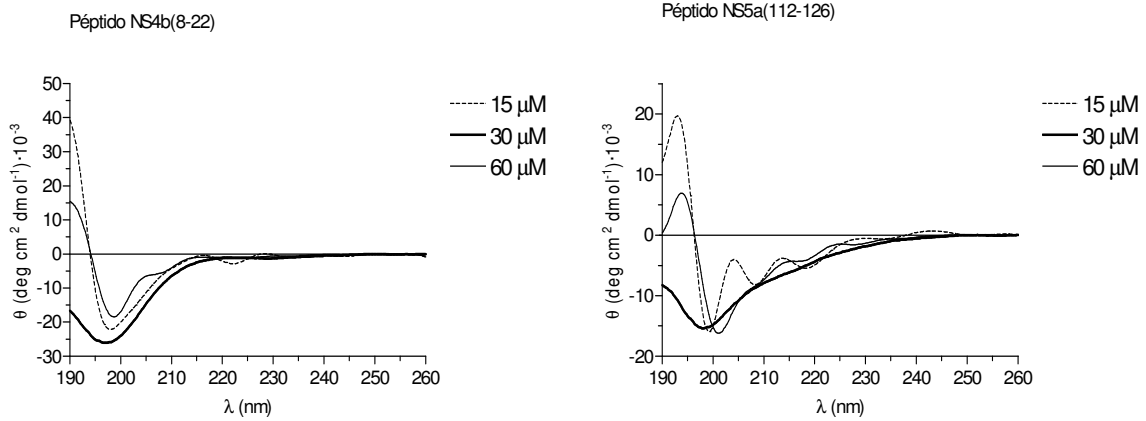
Es conveniente la utilización de diversos métodos ya que cuánto más similares sean los resultados proporcionados por cada uno de ellos más fiable será la estimación del espectro.

### 3.1.2 Estudio conformacional de los péptidos NS4b(8-22), NS5(112-126), Qm1 y Qm2

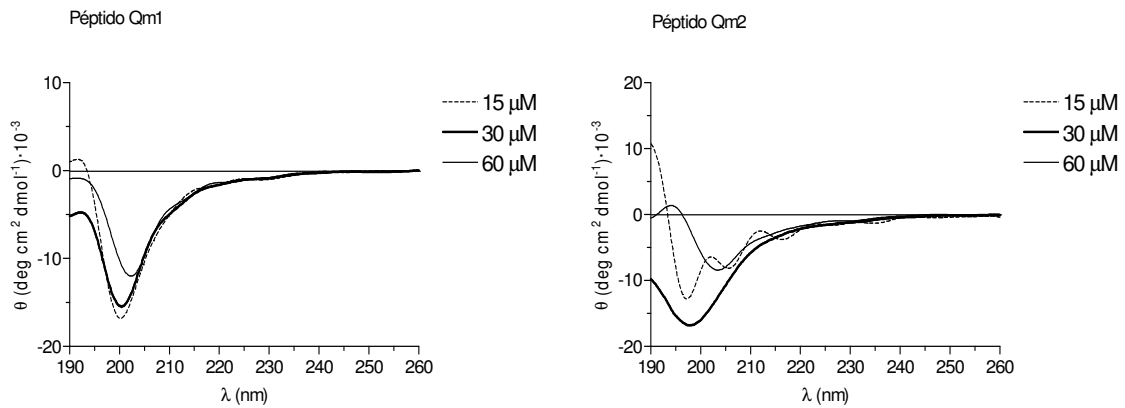
El estudio de CD se realizó con la finalidad de estudiar si existían diferencias estructurales entre los péptidos monoepitópicos y los péptidos diepitópicos. Se realizaron análisis tanto en medio acuoso como en presencia de disolventes fluorados.

#### 3.1.2.1 Ensayo en medio acuoso

Los experimentos iniciales de CD se realizaron con diferentes concentraciones de los péptidos disueltos en una disolución de Hepes 5 mM pH 7.4. Se estudiaron los espectros obtenidos de dichos péptidos a concentración 15, 30 y 60  $\mu$ M, no observándose diferencias significativas entre los espectros obtenidos (Figuras 3.4 y 3.5). En estas condiciones los espectros se caracterizaron todos ellos por presentar una banda negativa de máxima absorción próxima a 195 nm, la cual es indicativa de una conformación aperiódica o flexible, conocida también con la denominación *random coil*.



**Figura 3.4.** Espectros de dicroísmo circular obtenidos a distintas concentraciones para los péptidos NS4b(8-22) y NS5a(112-126) en medio tamponado acuoso a pH 7.4.

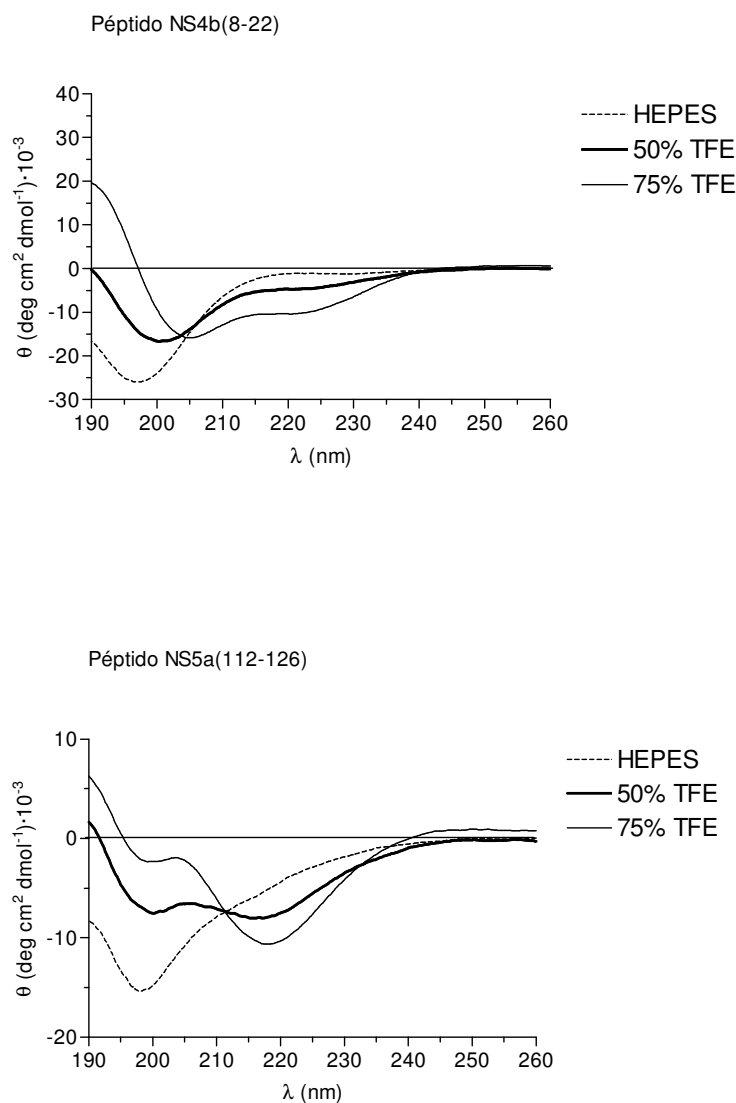


**Figura 3.5.** Espectros de dicroísmo circular obtenidos a distintas concentraciones para los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2 en medio tamponado acuoso a pH 7.4.

### 3.1.2.2 Ensayo en presencia de disolventes fluorados

En general, la estructura secundaria que un determinado fragmento peptídico adopta en el contexto de la estructura terciaria de una proteína está estabilizada por interacciones que se establecen en el mismo fragmento y de otras interacciones en que participan partes del resto de la

molécula nativa. En este sentido, no es de extrañar que un fragmento peptídico no tenga estructura en disolución acuosa. El efecto de los alcoholes fluorados como el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) y el 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) sobre la estructura de los péptidos y proteínas se ha estudiado durante mucho tiempo. En la actualidad, se sabe que estos cosolventes tienden a estabilizar la hélice  $\alpha$  aunque estructuras que contienen giros  $\beta$  y laminas  $\beta$  también pueden existir en presencia de estos alcoholes fluorados. Estos alcoholes se caracterizan por tener una constante dieléctrica relativamente baja y un momento dipolar alto, lo cual promueve el plegamiento de la cadena polipeptídica favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares.

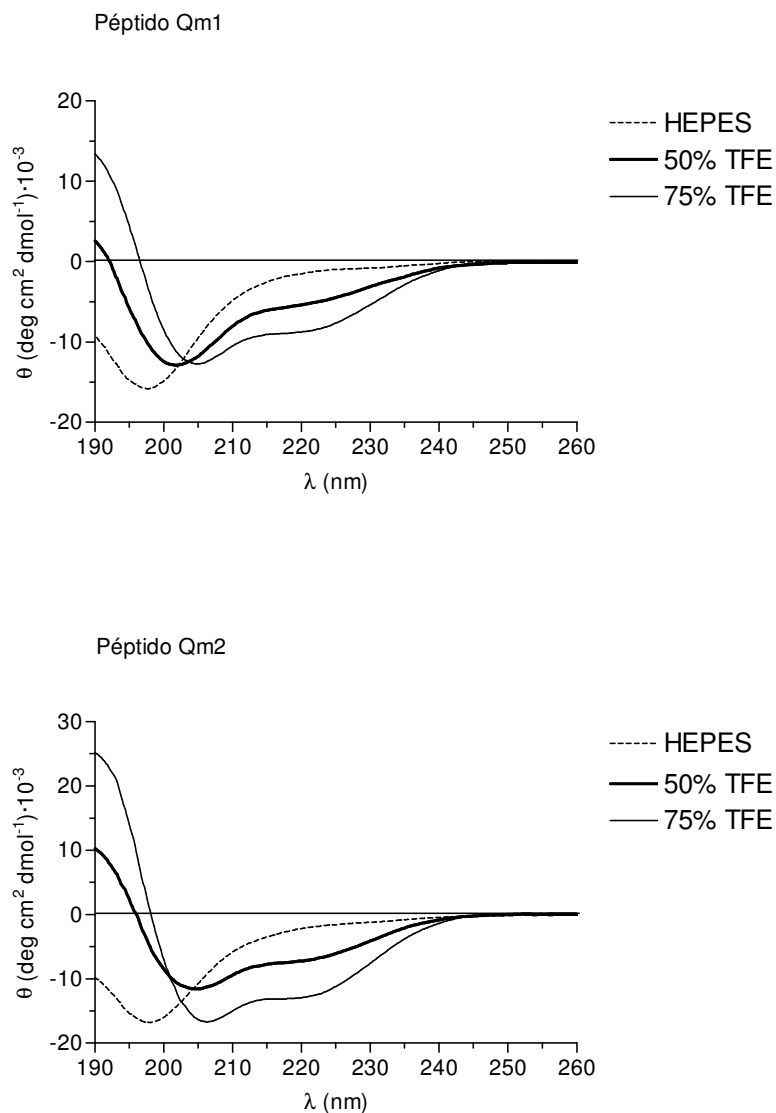


**Figura 3.6.** Espectros de dicroísmo circular obtenidos a una concentración de 30  $\mu$ M para los péptidos NS4b(8-22) y NS5a(112-126) en presencia de TFE.

Se estudiaron los cambios producidos en los espectros tras la adición de diferentes porcentajes de TFE en el medio de disolución. En la Figura 3.6 se muestran los espectros obtenidos para las secuencias NS4b(8-22) y NS5a(112-126) en presencia de TFE. Como se puede observar en la figura, a medida que aumenta el porcentaje de alcohol halogenado los péptidos tienden a estabilizar una estructura secundaria. Puede observarse una clara tendencia del péptido NS4b(8-22) a estabilizar una hélice  $\alpha$  a concentraciones crecientes de TFE. Por el contrario, en el caso del péptido NS5a(112-126), al aumentar la concentración de agente estructurante existe un desplazamiento de la banda negativa hacia longitudes de onda superiores y aparece una banda negativa alrededor de 220 nm, más característica de una estructura de lámina  $\beta$ .

En el caso de los péptidos quiméricos (Figura 3.7), a medida que aumenta la concentración del disolvente fluorado, aparecen bandas negativas localizadas a 201-206 nm y 222 nm, que indican que existe una mezcla de conformaciones (hélice  $\alpha$  y giro  $\beta$ ). Como puede observarse en el espectro para el péptido quimérico Qm1, la transición  $n \rightarrow \pi^*$  (222 nm) exhibe menos intensidad respecto a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  paralela (208 nm) y tiende a experimentar un desplazamiento hacia la región azul. Estas pequeñas diferencias observadas entre los espectros de los péptidos quiméricos, sugieren que el péptido Qm1 tiende a adoptar una conformación del tipo hélice  $3_{10}$ , mientras los espectros del péptido Qm2 se ajustan mejor a una conformación de hélice  $\alpha$ .

El análisis cuantitativo de los datos experimentales realizado por la medida de la elipticidad a 222 nm y la utilización de programas informáticos de deconvolución de espectros se muestra en la Tabla 3.2. De acuerdo con los datos teóricos predictivos, los cuatro péptidos presentan en medio acuoso una mezcla de conformaciones de tipo  $\beta$  y desordenada, siendo ésta última mayoritaria. A medida que aumenta el porcentaje de TFE en el medio, aumenta el contenido de estructura de tipo helicoidal, a expensas de la pérdida tanto de estructura desordenada como de hoja  $\beta$ . El péptido NS4b(8-22) se estabiliza rápidamente en estructura de hélice  $\alpha$ , llegando a mostrar hasta un 33% de estructura  $\alpha$  cuando el porcentaje de TFE es del 75%. Para este péptido el contenido de estructura desordenada disminuye desde un 49% (en tampón Hepes) hasta alrededor del 34% (75% de TFE). En el caso del péptido NS5a(112-126), la presencia de alcohol fluorado contribuye a estabilizar estructuras ordenadas del tipo hoja  $\beta$  (37%) más que de tipo hélice  $\alpha$  (2%), y el contenido de estructura desordenada sigue manteniéndose elevado en estas condiciones.



**Figura 3.7.** Espectros de dicroísmo circular obtenidos a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  para los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2 en presencia de TFE.

Las diferencias existentes entre los contenidos estructurales para cada péptido según el programa informático utilizado se deben a que el programa K2D permite cuantificar las estructuras  $\beta$  en general, mientras que el programa Contin permite diferenciar si el tipo de estructura secundaria es de lámina o de giro  $\beta$ .

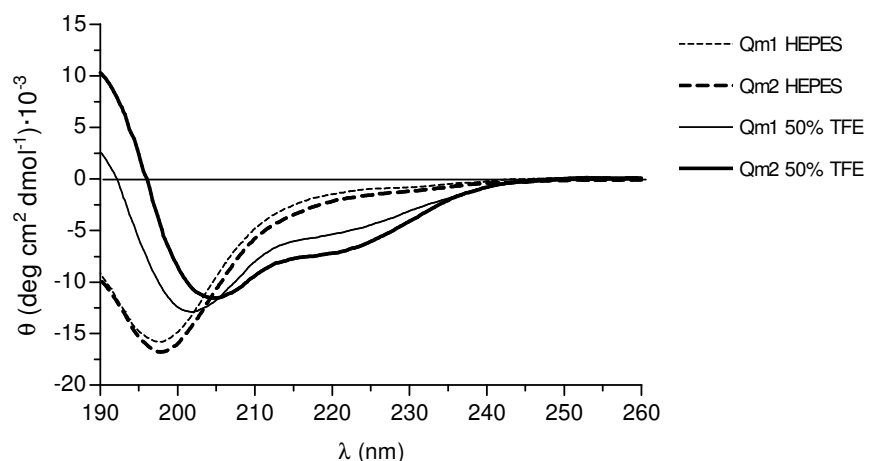
**Tabla 3.2.** Análisis de la conformación, mediante los programas Contin, K2D y la elipticidad a 222 nm, de los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2 en medio acuoso y en presencia de TFE. rc: *random coil* o estructura desordenada.

	tampón Hepes				50% TFE				75% TFE			
Contin												
	hélice α	hoja β	giro β	rc	hélice α	hoja β	giro β	rc	hélice α	hoja β	giro β	rc
NS4b(8-22)	8	17	26	49	15	25	24	36	33	13	20	34
NS5a(112-126)	9	26	24	41	8	32	24	36	2	37	22	40
Qm1	7	28	24	41	15	27	24	34	24	22	23	32
Qm2	8	26	24	42	21	24	23	33	35	14	21	30
K2D												
	hélice α	estructura β	rc	hélice α	estructura β	rc	hélice α	estructura β	rc			
NS4b(8-22)	1	5	94	8	30	63	28	27	45			
NS5a(112-126)	7	49	43	15	30	55	31	13	56			
Qm1	7	48	46	9	39	53	24	20	55			
Qm2	5	39	55	16	28	56	29	17	54			
elipticidad a 222 nm												
	tampón Hepes			50% TFE			75% TFE					
NS4b(8-22)	3			14			30					
NS5a(112-126)	11			20			28					
Qm1	3			14			24					
Qm2	5			23			35					

Según el análisis cuantitativo de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2, el péptido Qm2 presenta un contenido de estructura hélice α mayor que el péptido Qm1 en presencia de TFE, siendo los porcentajes del 35% para el péptido Qm2 frente al 24% para el péptido Qm1. Como ya se ha comentado anteriormente este menor porcentaje en el contenido de hélice α para el péptido Qm1 puede indicar en el que el péptido adopte otro tipo de estructura no cuantificable mediante los programas informáticos. Al estudiar el cociente entre el valor de elipticidad a 222 nm y el valor de elipticidad menor de toda la curva, que suele situarse alrededor de 205 nm, se obtiene un valor de 0.60 para el péptido Qm2 mientras que para el péptido Qm1 este cociente es de 0.39. Según Formaggio et al. [164] valores de R comprendidos entre 0.15 y 0.40 se consideran diagnóstico de hélice  $3_{10}$  más que de una hélice α.

$$R = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{\lambda=205}}$$

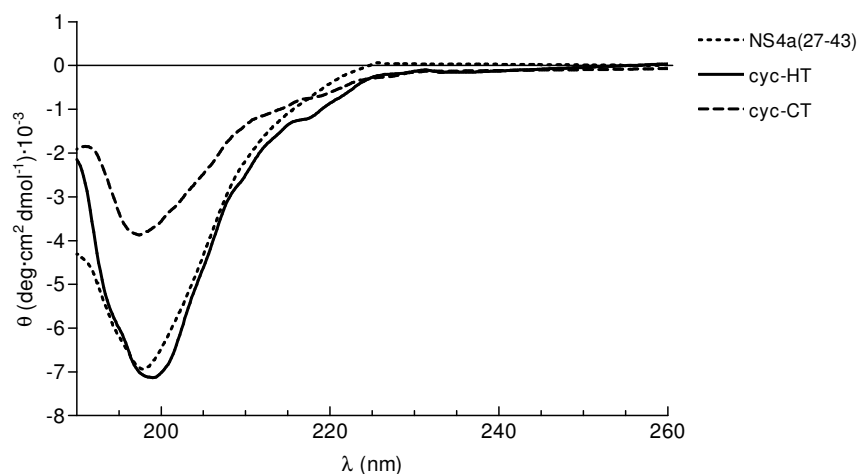




**Figura 3.8.** Espectros de dicroísmo circular de los péptidos quiméricos a una concentración de 30  $\mu$ M en tampón acuoso Hepes y en presencia de TFE.

### 3.1.3 Estudio conformacional de los péptidos NS4a(27-43), cyc-HT y cyc-CT

Se realizó un estudio conformacional comparativo de los péptidos cíclicos cyc-HT y cyc-CT con respecto a su precursor lineal NS4a(27-43) con la finalidad de estudiar si el hecho de introducir restricciones mediante la formación de enlaces intramoleculares en los péptidos contribuye a una mayor estabilización de la estructura secundaria en medio acuoso.



**Figura 3.9.** Espectros de dicroísmo circular de los péptidos NS4a(27-43), cyc-CT y cyc-HT a una concentración de 60  $\mu$ M en tampón acuoso Hepes.

El estudio inicial de CD de los péptidos NS4a(27-43) y de sus derivados cíclicos, cyc-HT y cyc-CT se realizó utilizando una concentración de 60  $\mu$ M disuelto en tampón acuoso Hepes 5 mM pH

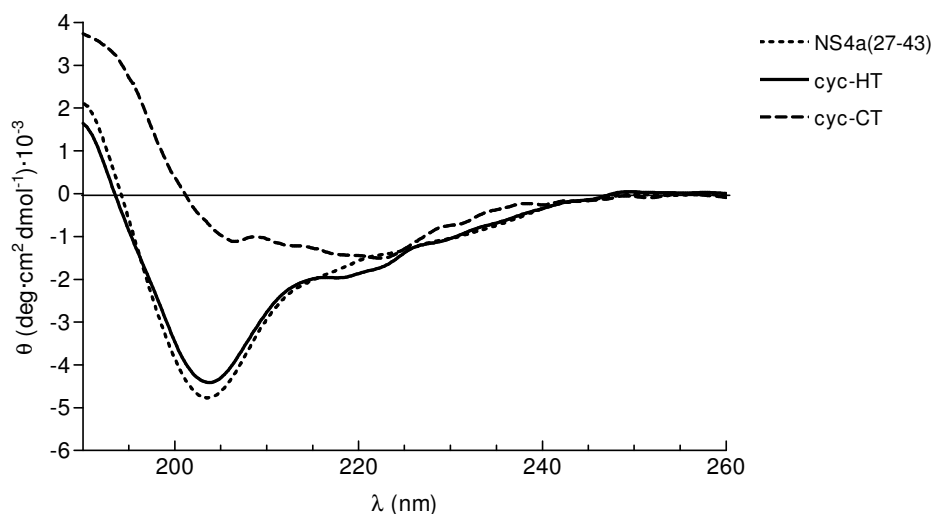
7.4. En este medio los espectros de los péptidos NS4a(27-43) y cyc-HT fueron muy similares y se caracterizaron por la presencia de una banda negativa próxima a 195 nm característica de conformaciones aperiódicas, tal y como puede observarse en la Figura 3.9.

Sin embargo, el espectro del péptido cyc-CT presentó una banda negativa también en la región cercana a 195 nm aunque con una intensidad de banda sensiblemente menor que la observada para los péptidos NS4a(27-43) y cyc-HT. Este tipo de espectros están asociados a conformaciones plegadas tipo giro  $\beta$ , más que a cualquier otra estructura secundaria de tipo periódica [165].

### 3.1.3.1 Influencia de los disolventes fluorados

También se estudió el efecto de los agentes fluorados en la estructura que adoptan los péptidos. Se estudiaron los espectros obtenidos al disolver los péptidos en un 75% de TFE. En la Figura 3.10, se muestran los perfiles de CD obtenidos para los tres péptidos en presencia de TFE.

Así como en medio tamponado de Hepes, los péptidos NS4a(27-43) y cyc-HT no mostraron ninguna conformación ordenada, en presencia de TFE sí se pudo observar un mayor grado de estructuración de las mencionadas construcciones. Puede observarse un desplazamiento de las bandas del espectro hacia longitudes de onda comprendidas entre 201 y 206 nm, así como la aparición de una banda negativa débil centrada aproximadamente a 222 nm, lo que sugiere la preferencia para adoptar conformaciones helicoidales. La aparición de bandas en las regiones próximas a 208 y 222 nm es característica de estructuras de tipo hélice  $\alpha$ , siempre que las intensidades de ambas bandas sean similares. El hecho de que la banda debida a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  (banda negativa a 222 nm) sea significativamente menor que la banda debida a la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  paralela (banda negativa alrededor de 208 nm), y de que además esta última banda esté desplazada hacia longitudes de onda menores (201-206 nm) sugiere que tanto el péptido NS4a(27-43) como el derivado cyc-HT tienden a adoptar preferiblemente estructuras del tipo hélice  $3_{10}$ , definidas como un confórmero intermedio entre hélice  $\alpha$  y giro  $\beta$ .



**Figura 3.10.** Espectros de dicroísmo circular de los péptidos NS4a(27-43), cyc-CT y cyc-HT a una concentración de 60  $\mu\text{M}$  en presencia de un 75% de TFE.

Por el contrario, en las mismas condiciones (75% TFE), el péptido cyc-CT mostró dos bandas negativas de intensidad similar, una de ellas a 203 nm y la segunda a 222 nm. Esta baja intensidad de las bandas en comparación con la de los espectros obtenidos para el péptido lineal NS4a(27-43) y el derivado cyc-HT, sugieren una mayor capacidad del péptido cyc-CT para adoptar conformaciones más empaquetadas que las hélices, como son las estructuras  $\beta$ .

En la Tabla 3.3 se muestran los porcentajes de helicidad a 222 nm calculados según los parámetros de Yang [160] y también el contenido de las diferentes estructuras obtenido tras la deconvolución de los espectros empleando el programa informático Contin. Como puede observarse, los valores de helicidad a 222 nm son muy similares para los tres péptidos tanto en medio acuoso como en presencia de TFE.

**Tabla 3.3.** Análisis de la conformación, mediante el programa Contin y la elipticidad a 222 nm, de los péptidos NS4a(27-43), cyc-CT y cyc-HT en medio acuoso y en presencia de TFE. rc: *random coil* o estructura desordenada.

	Hepes				75% TFE			
Contin								
	hélice $\alpha$	hoja $\beta$	giro $\beta$	rc	hélice $\alpha$	hoja $\beta$	giro $\beta$	rc
NS4a(27-43)	9	35	24	34	11	35	27	31
cyc-HT	7	35	23	35	9	35	23	33
cyc-CT	7	37	23	33	8	38	22	33
elipticidad a 222 nm								
NS4a(27-43)	0				4			
cyc-HT	2				5			
cyc-CT	1				4			

El programa Contin cuantificó porcentajes de hélice  $\alpha$  de hasta el 11% para el péptido NS4a(27-43) y de un 35% de contenido en lámina  $\beta$  en presencia de TFE. Se obtuvieron valores similares para el péptido cíclico cyc-HT, mientras que para el derivado cyc-CT el contenido en lámina  $\beta$  fue ligeramente superior (38%), a expensas de un menor contenido en estructura helicoidal (8%).

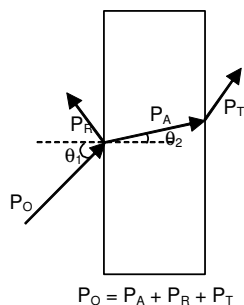
A pesar de que las diferencias encontradas al cuantificar la contribución de cada una de las estructuras en la conformación real del péptido son sensiblemente pequeñas, se puede decir que la construcción cyc-CT, que contiene el ciclo más pequeño (12 residuos) mostró espectros más característicos de estructuras empaquetadas, mientras que tanto el péptido lineal como la construcción cyc-HT, que contiene el ciclo de mayor tamaño (17 residuos) presentaron espectros en los que predomina la contribución de las estructuras helicoidales.

### 3.2 Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo (IR) permite el estudio de las vibraciones moleculares cuando se produce una interacción de radiación electromagnética con la materia. Esta interacción puede deberse a la excitación de los electrones, a vibraciones moleculares o bien a rotaciones moleculares. La molécula al absorber radiación infrarroja, cambia su estado de energía vibracional y rotacional. Los cambios en la energía vibracional pueden deberse sobre todo a cambios en la distancia del enlace (elongaciones) y cambios en el ángulo del enlace.

El espectro de IR se puede dividir en tres zonas diferenciadas: IR cercano, que comprende el intervalo de 13330-4000  $\text{cm}^{-1}$ , donde se producen absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales; IR medio 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , donde tienen lugar las vibraciones fundamentales; y por último, IR lejano de 400-10  $\text{cm}^{-1}$ , donde se producen las absorciones debidas a cambios rotacionales. La información que proporciona un espectro de IR es característica para cada sustancia, por este motivo, esta técnica permite caracterizar moléculas con un cierto grado de especificidad. La técnica es muy utilizada para el análisis cualitativo, pero debido a su baja sensibilidad, se ha utilizado muy poco para análisis cuantitativos.

Cuando la radiación infrarroja incide en la muestra (Figura 3.11), ésta puede experimentar diferentes fenómenos: absorción, transmisión y reflexión. Es en la absorción (o intensidad transmitida) en lo que está basada la medida en la espectroscopia de IR.



**Figura 3.11.** La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra ( $P_T$ ) es menor que la intensidad incidente ( $P_O$ ). Una parte de esta intensidad se refleja ( $P_R$ ), mientras que otra parte ha sido absorbida por la sustancia ( $P_A$ ).

La espectroscopia de IR empezó a utilizarse en la determinación de la estructura de péptidos hacia 1950, permitiendo desde entonces complementar los datos estructurales obtenidos mediante dicroísmo circular con esta técnica [166].

### 3.2.1 Asignación de bandas

El cromóforo más importante es el enlace peptídico, que se repite a lo largo de la estructura. El espectro es complicado ya que los enlaces peptídicos están en distintos entornos y los puentes de hidrógeno de las amidas, cuando forman estructuras secundarias, producen importantes desplazamientos de las correspondientes bandas vibracionales.

Para llevar a cabo el estudio de la estructura secundaria de péptidos se analizan las bandas de absorción debidas a los modos de vibración del enlace peptídico denominadas bandas amida. De las nueve bandas amida existentes la más estudiada es la banda amida I, que aparece entre 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ . La amida I se produce fundamentalmente por vibraciones de tensión del enlace C=O del enlace peptídico [167], acopladas con vibraciones de tensión del enlace C-N. La frecuencia de las vibraciones depende de los puentes de H que establezcan los grupos C=O y N-H, y el patrón de puentes de H depende a su vez de la estructura secundaria que adopte la proteína, de ahí la sensibilidad de la banda amida I a cambios en la conformación de las proteínas y péptidos [168]. Las bandas amida I de péptidos y proteínas están compuestas de bandas superpuestas que representan diferentes estructuras secundarias. La posición de la banda depende del tipo de estructura adoptada por el péptido, y normalmente es el resultado de varios componentes solapados, cada uno de los cuales corresponde a un tipo de estructura secundaria.

Hay que tener en cuenta que en esta banda aparece también una señal intensa hacia 1640  $\text{cm}^{-1}$  debida a la vibración de la molécula de agua, por este motivo se utiliza en los análisis agua deuterada lo que conlleva un ligero desplazamiento de la banda amida I, dando lugar a la denominada banda amida I' [169]. En 1989 Cabiaux [170,171] dividió la banda I en diferentes regiones que asignó a las diferentes estructuras que pueden adoptar los péptidos y las proteínas. Las asignaciones las hizo asumiendo que la muestra se encontraba en  $\text{D}_2\text{O}$ . En la Tabla 3.4 se muestra el rango de frecuencias asignadas a cada una de las estructuras secundarias.

**Tabla 3.4.** Asignación más frecuente de los componentes de la banda amida I'. Estas asignaciones no son fijas, sino que existe un pequeño margen dependiendo de las características de cada péptido.

estructura	número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	
hélice $\alpha$	1648-1660	banda intensa
	1615-1627	banda débil
hoja $\beta$	1628-1638	banda intensa
	1682-1689	banda débil
desordenada	1638-1644	banda intensa
giro $\beta$	1661-1682	banda intensa

La hélice  $3_{10}$ , estructura frecuente en péptidos también se ha estudiado mediante la espectroscopia de IR. A esta estructura se le atribuyen las bandas que aparecen entre 1662 y 1666  $\text{cm}^{-1}$ . Métodos con una gran resolución revelan además, pequeñas contribuciones hacia 1678-1681 y 1644-1646  $\text{cm}^{-1}$ . En los espectros de los péptidos que contienen tanto hélices  $\alpha$  como hélices  $3_{10}$  aparecen las bandas características de las dos conformaciones [172,173].

### 3.2.1.1 Deconvolución de los espectros IR

Las bandas que se obtienen en los espectros de FT-IR son de tipo Lorentziano o Gaussiano. El análisis de la estructura secundaria presente en una proteína mediante FT-IR se basa en dos parámetros. Por un lado la frecuencia máxima de la banda que indica que tipo de estructura predomina, y por otro lado el área de la banda que se puede relacionar con el contenido en dicha estructura [174].

En la segunda derivada de la función, los mínimos de ésta coinciden con los valores de los máximos de las bandas que componen la curva de FT-IR, que quedan ocultos debido al solapamiento de las bandas. En la cuarta derivada, los máximos son los que indican la localización de las componentes del espectro de FT-IR.

### 3.2.2 Estudio comparativo de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2

Los estudios de espectroscopia de infrarrojo se realizaron con la finalidad de profundizar en los resultados conformacionales de los péptidos obtenidos mediante la técnica de dicroísmo circular.

Para comparar los resultados, los péptidos fueron estudiados en los mismos entornos. En primer lugar, en medio acuoso (en este caso agua deuterada) y en segundo lugar, se realizaron los análisis empleando el mismo agente estructural que en el dicroísmo circular, el TFE. Los espectros obtenidos, para los péptidos Qm1 y Qm2 se muestran en las figuras siguientes.

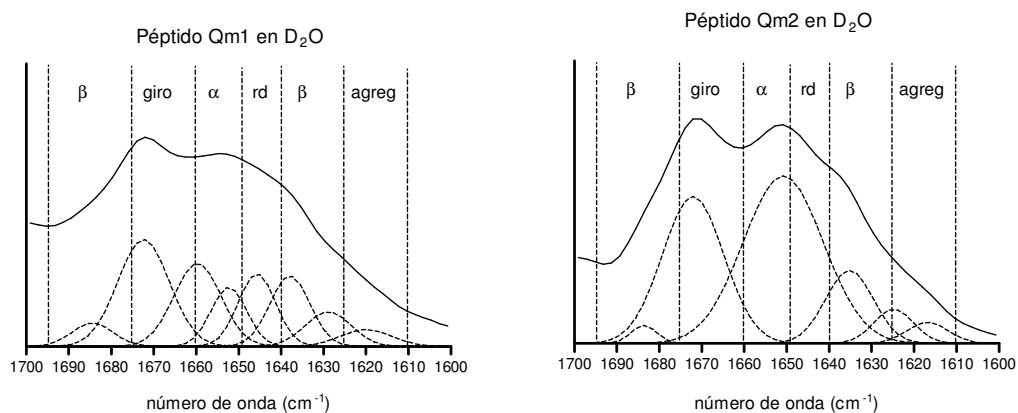


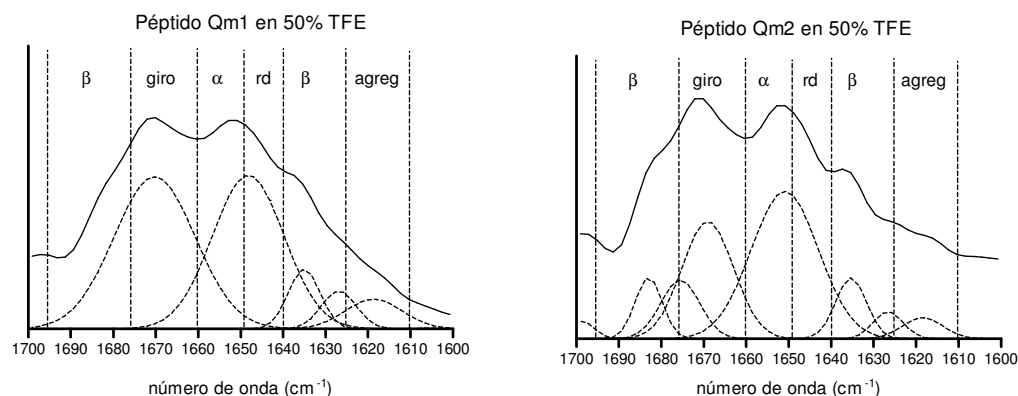
Figura 3.12. Espectros de FT-IR obtenidos para los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2 en D<sub>2</sub>O.

Una vez realizada la descomposición de los espectros en las curvas que los componen, pudo observarse, que en medio acuoso, la secuencia Qm1 exhibió un número elevado de bandas, todas ellas de baja intensidad, lo que sugiere que en este entorno, el péptido quimérico Qm1 no adopta una

conformación ordenada, llegando a la misma conclusión que la obtenida tras los estudios de dicroísmo circular.

Por el contrario, al observar las curvas que componen el espectro correspondiente al péptido quimérico Qm2 en medio acuoso, se observó una banda intensa centrada en  $1651\text{ cm}^{-1}$  característica de una conformación en hélice  $\alpha$ . Para conocer el grado de contribución de cada una de las bandas en la conformación final del péptido se calcularon las áreas bajo las curvas de cada una de las componentes empleando el programa Peakfit. De este modo, se estimó que la curva correspondiente a una conformación de hélice  $\alpha$  tenía un área del 47% respecto al total. En este mismo entorno, también puede observarse una segunda curva con un área menor (31%) centrada a  $1672\text{ cm}^{-1}$ , asociada a estructuras plegadas tipo giro.

En presencia de un 50% de TFE (Figura 3.13), en el espectro correspondiente al péptido Qm1, pudo observarse un incremento en el área de la curva centrada a  $1649\text{ cm}^{-1}$  y  $1670\text{ cm}^{-1}$ , atribuible a estructuras de tipo hélice  $\alpha$  y giro  $\beta$ , respectivamente. Este resultado es indicativo de que en estas condiciones el TFE tiene capacidad para estabilizar estructuras más ordenadas.



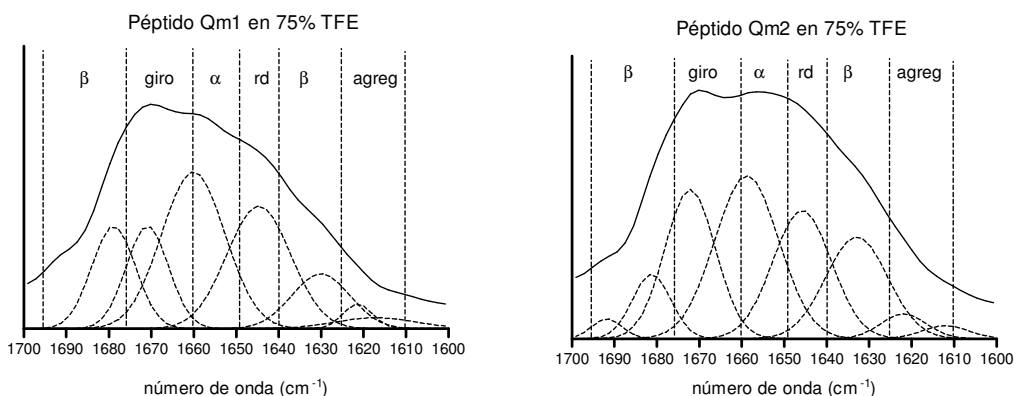
**Figura 3.13.** Espectros de FT-IR obtenidos para los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2 en presencia de un 50% de TFE.

En el caso del péptido Qm2, la descomposición del espectro en las curvas que lo componen mostró una banda de gran intensidad, con un área del 46% respecto al total, centrada en  $1651\text{ cm}^{-1}$ , lo que muestra que la presencia del agente estructurante mantiene la conformación de hélice  $\alpha$  que el péptido es capaz de adoptar en medio acuoso. En estas condiciones también puede apreciarse una curva con un máximo en  $1668\text{ cm}^{-1}$  que representa un 28% del total del área del espectro, asociada a estructuras más plegadas como son los giros  $\beta$ .

Al aumentar el contenido de TFE en el medio hasta un 75% el espectro correspondiente al péptido Qm1 mostró una curva con un máximo en  $1660\text{ cm}^{-1}$  y un área del 32%, asociada a una



conformación hélice  $\alpha$ , que demuestra que sigue manteniéndose la conformación ordenada en la molécula. En este caso, el espectro se descompone en un número mayor de curvas que las obtenidas en los ensayos anteriores y pueden observarse curvas centradas en  $1645\text{ cm}^{-1}$  y  $1680\text{ cm}^{-1}$ , con áreas relativas del 24% y 14%, respectivamente, atribuibles según algunos autores [172] a conformaciones de hélice  $3_{10}$ . El espectro obtenido para el péptido Qm2 mostró también dos bandas con áreas de 31% y 23%, los máximos de las cuales se encuentran en  $1659\text{ cm}^{-1}$  y  $1672\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, asociadas también a estructuras ordenadas de hélice  $\alpha$  y giro  $\beta$ .



**Figura 3.14.** Espectros de FT-IR obtenidos para los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2 en presencia de un 75% de TFE.

En resumen, estos resultados sugieren que existe un predominio de mezclas de estructuras menos plegadas para el péptido Qm1, como son las hélices  $3_{10}$  y hélices  $\alpha$ , mientras que el péptido Qm2 tiene mayor capacidad para adoptar una conformación de hélice  $\alpha$  en medio acuoso y adoptar conformaciones más plegadas, como son los giros en presencia de agentes estabilizadores de estructura secundarias.

### 3.3 Recapitulación

Las técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular y espectroscopia de infrarrojo han proporcionado datos sobre la estructura secundaria de los péptidos quiméricos y de las construcciones cíclicas, que nos permiten un mejor entendimiento del distinto comportamiento antigénico de dichas moléculas. Los datos obtenidos permiten concluir que un mayor grado de ordenación está relacionado con una mayor sensibilidad en los inmunoensayos.

Aunque los ensayos de ELISA realizados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2, los estudios conformaciones sí que sugieren la existencia de pequeñas diferencias estructurales entre los dos péptidos, debido, probablemente a la distinta disposición de los dos epítopos que los conforman. Mientras que el péptido Qm2 tiende a adoptar estructuras de tipo hélice  $\alpha$ , tal y como sugieren tanto los resultados de CD como los de FT-IR, el péptido Qm1 muestra en todos los entornos estudiados un contenido menor de esta estructura a expensas de un mayor contenido en estructuras tipo  $\beta$ .

En cuanto a las construcciones cíclicas, la variación significativa observada en su carácter antigénico, sugiere que los péptidos con restricción de movilidad adoptan un cierto grado de organización estructural que podría relacionarse con una mejor mimetización entre el epítipo peptídico y la región correspondiente en la proteína entera.

La macrociclación de la secuencia NS4a(27-43) para obtener el ciclo de mayor tamaño, cyc-HT, no parece haber proporcionado una restricción conformacional suficiente, como demuestran los resultados obtenidos por DC, debido a que este péptido exhibe una estructura menos ordenada que el ciclo de menor tamaño, cyc-CT. Se observa pues, que la reducción de tamaño del anillo disminuye el repertorio conformacional; mientras que el ciclo cyc-HT muestra una conformación intermedia entre hélice  $\alpha$  y giro  $\beta$  (hélice  $3_{10}$ ), el péptido cyc-CT adopta preferentemente estructuras más plegadas. En relación con los ensayos de ELISA, aunque la ciclación ha demostrado su utilidad como una buena aproximación para incrementar la sensibilidad antigénica de los péptidos lineales, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos ciclos para el panel de sueros de pacientes sometidos a hemodiálisis, lo que podría sugerir que la unión a la fase sólida origina cambios en la disposición del epítipo, dificultando la adopción de la conformación más bioactiva.

