

Predicción de epítomos consensos de células B lineales en *Plasmodium falciparum* 3D7

Raúl Isea*

Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas. Baruta, Venezuela.

email: raul.isea@gmail.com

En la actualidad se estima que la mitad de la población humana puede contraer malaria y se carece de una vacuna en producción contra dicho flagelo, aunque las esperanzas están centradas en una llamada RTS,S/AS02. Es por ello que se debe continuar desarrollando metodologías computacionales que permitan el diseño racional de vacunas potencialmente efectivas. En ese sentido se propuso una nueva metodología computacional que predijera posibles epítomos consensos de células B lineales, presentes en el genoma del *Plasmodium falciparum* 3D7, a partir de la información disponible en la base de datos IEDB. Se descartaron aquellos que aparecían repetidos y se reagruparon en bloques, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante los programas Redundancy y Nomad, respectivamente. Por último, se predijo su posible carácter antigénico con ayuda de los programas BepiPred, BcePred y BCPred. Por los resultados que se obtuvieron con esta metodología se destacaron tres secuencias potencialmente antigénicas de las 45 predichas, pero es imposible asegurar cuál de ellas es la más antigénica sin evidencia experimental.

Palabras clave: epítomos de células B, vacuna, malaria, ExPASy, *Plasmodium falciparum*.

Introducción

La malaria o paludismo es una enfermedad tropical causada por el parásito *Plasmodium* y solo cinco cepas afectan a la especie humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*; esta última desde 1965, a raíz del primer caso registrado en los Estados Unidos (1). Se estima que el 50% de la población mundial está actualmente en riesgo de contraer la malaria (2) y entre dos y tres millones de personas mueren anualmente por esa causa.

Las esperanzas están centradas en una vacuna experimental llamada RTS,S/AS02, que posee una región central repetitiva y altamente conservada, donde se ha determinado la existencia de numerosos epítomos B flanqueados por zonas no repetitivas que se alternan con fragmentos inmunogénicos de los epítomos T generados por respuestas CD4+ y CD8+, cuyo rango de protección puede llegar a alcanzar hasta 45 meses (3).

Sin embargo, se debe ampliar la duración de la protección de dicha vacuna. Por ello es importante desarrollar nuevas estrategias computacionales que nos permitan predecir aquellos epítomos que desencadenen una mayor respuesta humoral y celular. De hecho, se dispone de la base de datos de epítomos llamada IEDB (*Immune Epitope Database*, por sus siglas en inglés), curada manualmente y de acceso abierto, donde se encuentra una amplia gama de información sobre ensayos experimentales publicados en la literatura científica que versan sobre enfermedades parasitarias, cáncer, HIV e influenza, entre otras (4).

Teniendo como punto de partida dicha base de datos, en el presente trabajo se planteó una nueva metodología computacional que permitió predecir posibles epítomos consensos de células B lineales, con vistas a que los mismos desempeñen un papel importante en el diseño de vacunas.

Materiales y Métodos

Los epítomos peptídicos se obtuvieron en la base de datos IEDB (accesible desde iedb.org). Seguidamente se eliminaron aquellos que se emplearon en más de una publicación para garantizar una distribución uniforme de la información.

Se verificó con el programa Redundancy, al que se accedió desde el servidor web ubicado en ExPASy (siglas en inglés de *Expert Protein Analysis System*, disponible en <http://expasy.org/tools/redundancy/>), con el objetivo de descartar aquellos epítomos iguales que aparecieran más de una vez.

El próximo paso fue determinar los epítomos consensos con la ayuda del programa Nomad, instalado también en ExPASy (accesible directamente desde <http://expasy.org/tools/nomad.html>). Este programa realiza un alineamiento múltiple local sin permitir brechas, así como la evaluación en forma iterativa de una función de entropía relativa, descrito por Hernández y cols (5).

Esos resultados se evaluaron independientemente por tres programas que permitieron predecir los epítomos B lineales, empleando como único dato su secuencia aminoacídica.

* Doctor en Ciencias Químicas.

BepiPred se basa en modelos de cadenas de Markov (6); mientras que el programa BcePred se basa en una combinación de diversas propiedades físico-químicas, tales como la hidrofiliidad, determinada por el método de Parker; flexibilidad, según la descripción realizada por Karplus y Schulz; su exposición al solvente, de acuerdo con Emini; grado de antigenicidad, descrita por Kolaskar y Tongaonkar (7). BCPred fue diseñado con algoritmos de aprendizaje, supervisado e implementado en computadoras de soporte vectorial (8). El trabajo publicado por Wang y cols, 2011, describe con más detalles dichos programas (9).

Resultados y Discusión

Se obtuvieron 271 epítomos B o T de la base de datos IEDB del tipo peptídico, presentes en el ciclo de vida del *P. falciparum* 3D7. Se verificó que no fueran iguales mediante el programa Redundancy. Posteriormente, se generaron los epítomos consensos en bloques de nueve aminoácidos, de acuerdo con el programa Nomad. Para lograrlo se descartaron aquellos cuya longitud era igual o inferior a 8 aminoácidos, con lo cual se eliminaron 41 epítomos de los 271 ya mencionados. Se excluyeron algunos como: NAYNM, KENCGA, RSMAPEN, DGNKENCG, cuyas longitudes corresponden con 5, 6, 7 y 8 aminoácidos, respectivamente.

En la Tabla 1 se muestran los 45 epítomos consensos resultantes mediante el programa Nomad, de los 230 epítomos obtenidos de IEDB, cuya extensión es igual o superior a 9. Es importante reseñar que se desconoce cuál debería ser la longitud ideal de esos epítomos consensos. Dicho estudio se pudo realizar con una longitud aminoacídica de 6, 7, 8, 10, 11 y 12. Solo ensayos experimentales posteriores podrían realmente elucidar la longitud ideal de los mismos. En tal sentido, Wang y cols, destacan esta misma observación, pero no logran completar su estudio en el trabajo publicado el 2011 (9).

A modo ilustrativo se muestra en la Figura 1 el procedimiento descrito anteriormente, donde se simplificaron solo tres epítomos obtenidos desde IEDB: APFDETLGEEDKDL, TLGEEDKLDEPEQF y YAGEPAPFDETLGEEDKDL. En el mismo se describen numéricamente los pasos expuestos en la sección anterior. Una vez obtenidos los epítomos desde IEDB (identificados con 1) se descartan todos aquellos cuya longitud fuera igual o inferior a 8 (paso 2); se observa el epítomo consenso obtenido con el programa Nomad, TLGEEDKDL (paso 3). Para resaltar el consenso entre dichas secuencias se colocaron los aminoácidos en gris claro.

Posteriormente se evaluaron los 45 epítomos consensos mostrados en la Tabla 1 con tres programas diferentes para la predicción de células B lineales. El programa BepiPred solamente predijo que potencialmente pueden ser antigénicos 13 de todos ellos y aparecen subrayados para su fácil identificación; BCPred solo predijo 10 y aparecen en negritas; mientras que BcePre arroja solo 8, identificados con un asterisco.

Solo tres epítomos potencialmente antigénicos son predichos por todos los predictores descritos en este trabajo, siendo los mismos TLGEEDKDL (proteína adhesiva relacionada a trombospodina, AAQ11894), AAEDKKTEY (MSP-6, ACJ63434) y MPNDPNRNV (proteína circumsporozoito, AAA29517), donde se ha colocado dentro de un paréntesis el nombre de la proteína proveniente e inmediatamente después el identificador ID, de acuerdo con la base de datos NCBI, accesible desde www.ncbi.nlm.nih.gov. Tanto la proteína adhesiva a trombospodina como la de circumsporozoito, ya se han empleado en otros estudios que involucra el diseño de vacunas contra la malaria, como se aprecia en el trabajo publicado por Portal y Calzada (10).

Tabla 1. Epítomos consensos derivados de las secuencias antigénicas provenientes de la base de datos IEDB.

ALERLLSLK (2515)	ALLIIPPKI	HLGNVKYLV (24217)	<u>NISKENDDV</u> *	SSPLFNNFY (61272)
<u>GTRSRKREI</u> (22805)	<u>MPNDPNRNV</u> * (42295)	DEVLYLLM (8190)	<u>TLGEEDKDL</u> *	SPCSVTCGK (60005)
QISTLKNDV	KCSSVFNVV	<u>SANKPKDEL</u>	IFLRFIPDK (26115)	<u>ELNNKKNEL</u> *
WYKMFVDF	<u>LPKREPLDV</u>	<u>QAAESNERY</u> * (50207)	LLACAGLAY (37073)	<u>ENNDQKKDM</u>
EVCNDEVDL	FFLKSKFNI (37073)	YLNKIQNSL (74841)	LVVILTDGI	FIHFFTWGT (16202)
FISFYLINK (16300)	NTSDSQKEC	<u>AAEDKKTEY</u> *	FIPLVFTL	FVSSIFISF
HVKITSWDK	KFNILSSPL (30792)	<u>ASKNKEKAL</u> (4506)	FLQMMNVNL	IAGGIAGGL
RLPVICSFL	FLESQSMNK*	<u>YQDPQNYEL</u> (75473)	RLFEEELGI (54528)	SFSDINKNI
ALLQVRKHL	VICSFLVFL (68914)	<u>WTSDSQKEC</u> *	YANDIEKKI (73400)	IVFLIFFDL

Los epítomos subrayados posiblemente son antigénicos, de acuerdo con el resultado obtenido en el programa BepiPre; los que aparecen en negritas son aquellos predichos por BCPred; los que tienen un asterisco son los predichos por BcePre y los que están dentro de un paréntesis corresponden al identificador en IEDB.

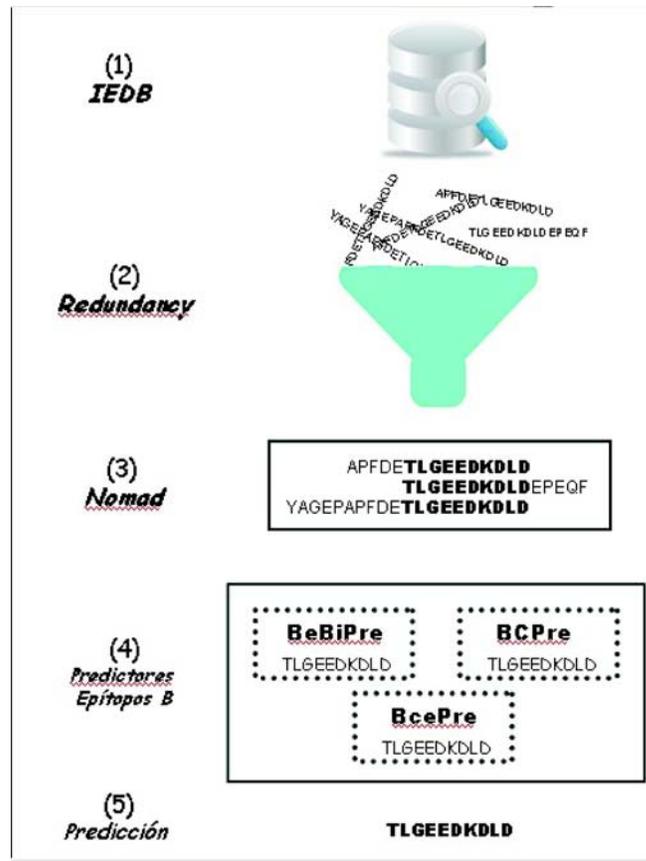


Fig. 1. Esquema de la metodología computacional propuesta para la predicción de epítomos de células B lineales.

(1): Información proveniente de la base de datos IEDB; (2): Se descartan aquellos epítomos que aparezcan más de una vez y aquellos que poseen una longitud aminoacídica igual o inferior a 8; (3): Epítomo consenso obtenido con el programa Nomad; (4): Se realizan predicciones de antigenicidad con tres programas diferentes; (5): Epítomos consensos obtenidos en el paso 3 y que a su vez son predichos como antigénicos.

Se procedió a realizar una búsqueda manual en la base de datos IEDB de cada una de las 45 secuencias mostradas en la Tabla 1, utilizando solo su secuencia aminoacídica. Al realizar dicha búsqueda 20 de los 45 se han usado en estudios antigénicos y, efectivamente, todos los resultados indicados con esta metodología computacional están centrados en *P. falciparum* y se indicó con un paréntesis el identificador correspondiente en IEDB.

En el presente trabajo se propuso una nueva metodología computacional que permitió predecir epítomos consensos de células B lineales a partir del volumen de información disponible en la base de datos IEDB, con la esperanza de que estos puedan llegar a ser eficientes en el desarrollo de una vacuna contra la malaria.

Finalmente, se debe realizar una validación experimental de la presente metodología propuesta mediante la inmunización con animales y con los sueros obtenidos, evaluados por ELISA, se verificaría si los anticuerpos del animal inmunizado son realmente efectivos con los epítomos consensos predichos.

Agradecimientos

Expresamos nuestro reconocimiento al Observatorio Científico Tecnológico en Vacunas, la Red Latinoamericana de Información Científico Técnica en Vacunas, la Red Iberoamericana de Tecnologías Convergentes NBIC en Salud y el Instituto Intercientífico de Paleopatología y Derechos Genoculturales-IPADEG, por la colaboración que nos dispensaron durante la realización de nuestro trabajo. Finalmente, a la Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA y a la VII Comisión Mixta Cuba-Venezuela por el financiamiento del proyecto para la implementación de una plataforma computacional en Bioinformática.

Referencias

1. Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys. *Science* 1965;149(3686):865.
2. World Health Organization (WHO). Malaria. Fact sheet No 94; Abril 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>

3. Sacarlal J, Aide P, Aponte JJ, Renom M, Leach A, Mandomando I, et al. Long Term Safety and Efficacy of the RTS,S/AS02A Malaria Vaccine in Mozambican Children. *J Infect Dis* 2009;200:329-36.
4. Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, et al. The Immune Epitope Database 2.0. *Nucleic Acids Res* 2010;38: 854-62.
5. Hernández D, Gras R, Appel R. Neighborhood functions and hill-climbing strategies dedicated to the generalized ungapped local multiple alignment. *Eur J Oper Res* 2006;185:1276-84.
6. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2006;2:2. Disponible en: <http://www.immunome-research.com/content/2/1/2>
7. Saha S, Raghava GPS. BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. *ICARIS* 2004;3239:197-204.
8. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recognit* 2008;21:243-55.
9. Wang Y, Wu W, Negre NN, White KP, Li C, Shah PK. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences. *BMC Bioinformatics* 2011;12(1):251. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/251>
10. Portal ES, Calzada RF. En busca de una vacuna antimalárica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2009;40:103-16.

Prediction of consensus linear B-cell epitopes in *Plasmodium falciparum* 3D7

Abstract

Today it is estimated that half world population can be infected by malaria and there is not an available vaccine, however, there is hope with vaccine RTS,S/AS02. For this reason, we must continue to develop computer methodologies and strategies that will allow the rational design of potentially effective vaccines. We propose a new computational approach to predict linear B-cell epitopes from the whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* 3D7, obtained from IEDB database. Those that were repeated were discarded and were grouped into blocks according to the obtained results by Redundancy and Nomad programs. Subsequently, the possible antigenic character was predicted using the programs BepiPred, BcePred and BCPred. Three potentially antigenic sequences out of the 45 predicted were obtained with this methodology, but it is not possible to say which one the most antigenic without experimental evidence.

Key words: B-cell epitope, malaria vaccine, ExpASy, *Plasmodium falciparum*.

Recibido: Julio de 2012

Aceptado: Septiembre de 2012