



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

EVALUACIÓN DE LA UNIÓN DE OCHO PÉPTIDOS DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO A LOS ALELOS MHC CLASE II: HLA -DR1 Y HLA -DR4.

MARITZA HERNANDEZ GONZALEZ
YURY KATHERINE HERRERA GOMEZ

Asesor:

LUIS EDUARDO VARGAS DIAZ

- *Aún no se dispone de una vacuna segura y eficaz que permita disminuir el impacto del VSRh en salud pública.*

Virus Sincitial Respiratorio Humano

- ARNss-
- 11 proteínas
- Las proteínas G y F son los mayores determinantes antigénicos.

- *Los ensayos de unión ofrecen un acercamiento experimental en la búsqueda de blancos terapéuticos contra diversos patógenos.*

MHC clase II : HLA-DR1, HLA-DR4

Presentación de antígenos a células T CD4.

Se expresan en células presentadoras de antígeno, como monocitos y células dendríticas.

Se estima que antes de los dos años de edad, el 95% de los niños se han infectado con el virus y aproximadamente un 50% se ha infectado hasta dos veces

Ensayos de unión /Algoritmos de predicción

- Ensayo de competencia
- Los algoritmos predictivos, tienen ventajas como el fácil manejo y bajo costo.

- *La unión MHC-péptido es la más selectiva para determinar epítopes de células T*

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

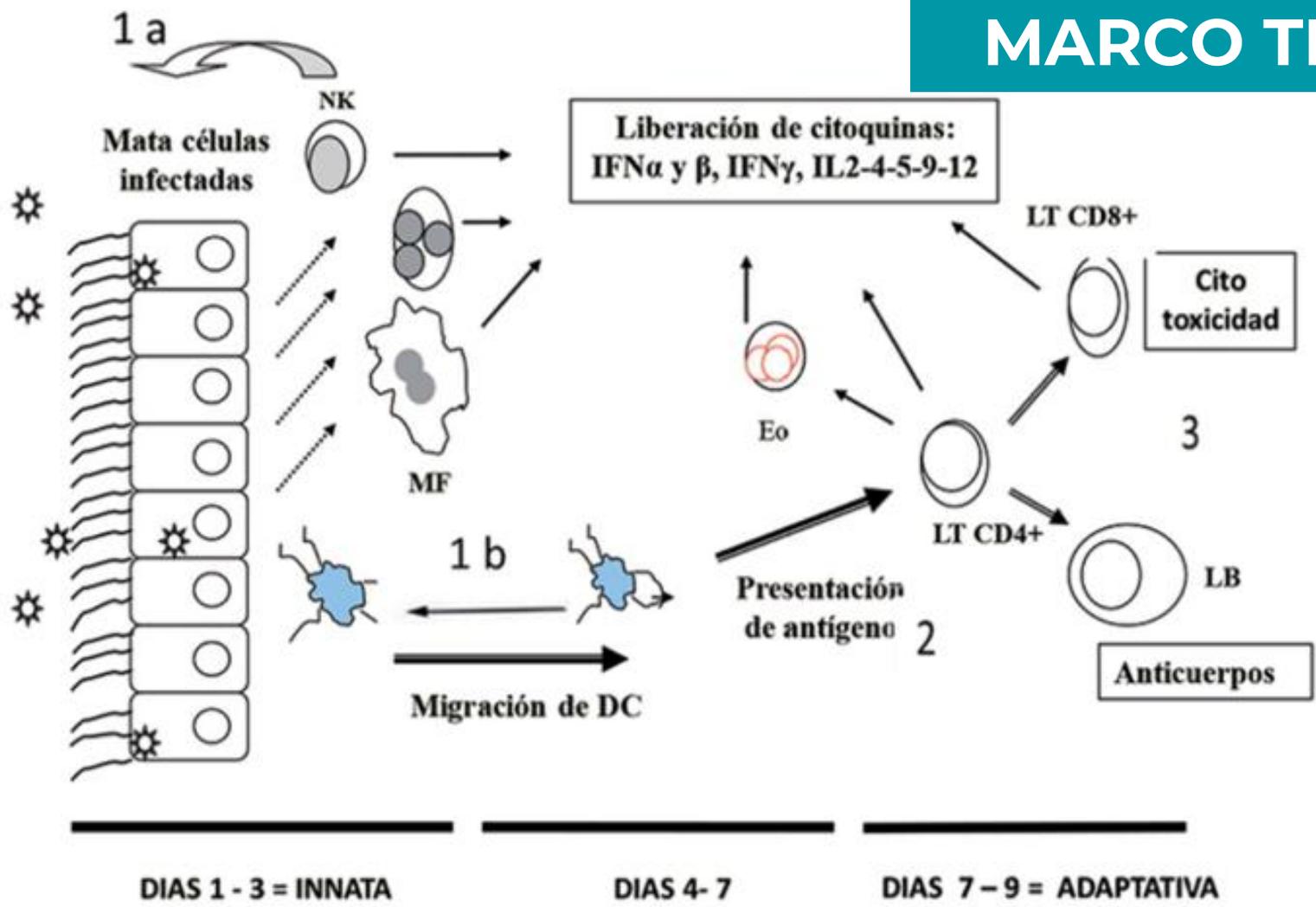
1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la unión de 8 péptidos del Virus sincitial respiratorio Humano a los alelos MHC clase II: HLA -DR1 Y HLA - DR4.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

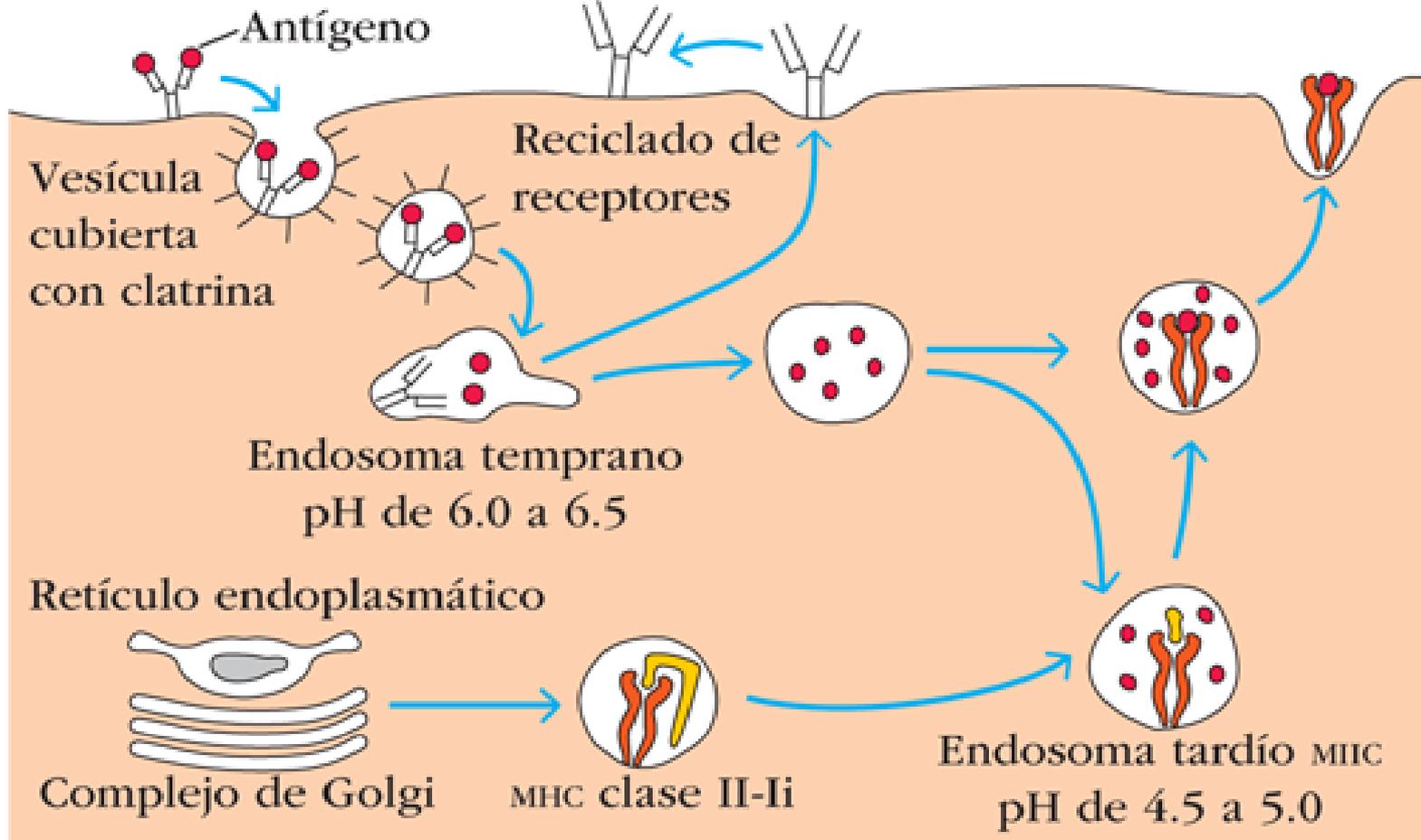
- Predecir valores de afinidad de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 por las moléculas HLA- DR1 y HLA-DR4 mediante el empleo del algoritmo PROPRED.
- Determinar experimentalmente el porcentaje de unión relativo de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 con las moléculas HLA- DR1 y HLA-DR4.
- Estimar cualitativamente la influencia de la molécula HLA- DM en la interacción de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 con los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4.

MARCO TEÓRICO

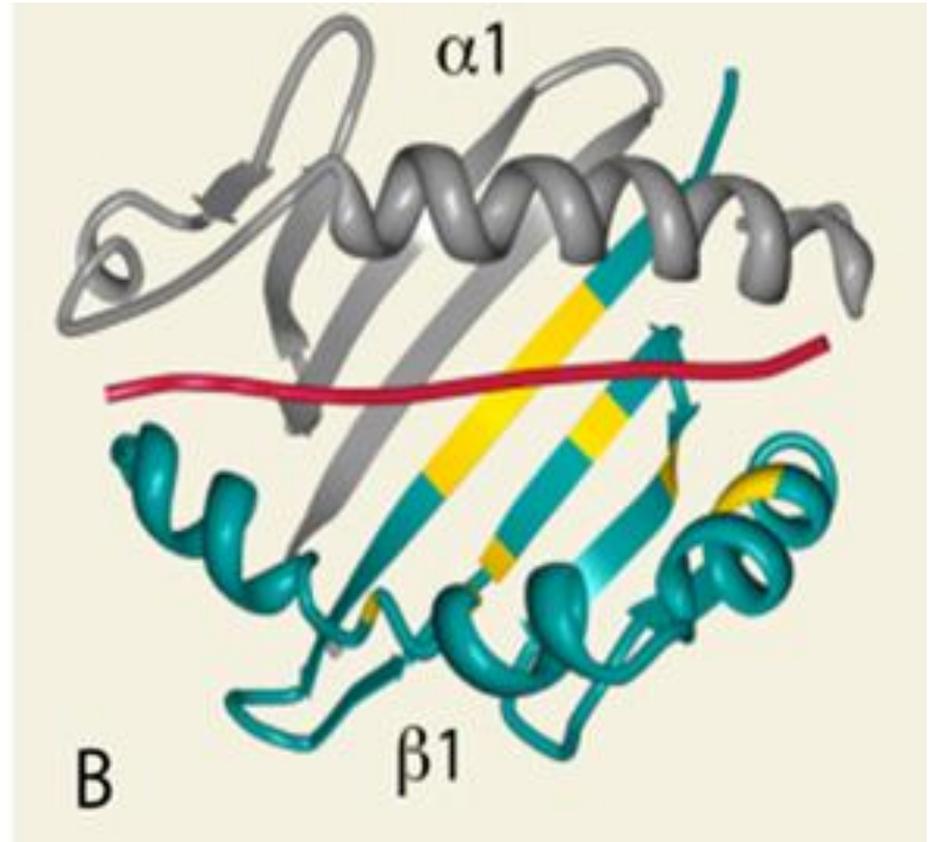


Rev. chil. enferm.
respir. vol.33 no.4
Santiago dic.
2017

<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482017000400293>



Fuente: Judith A. Owen, Jenni Punt, Sharon A. Stranford: *KUBY. Inmunología, 7e*:
www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.



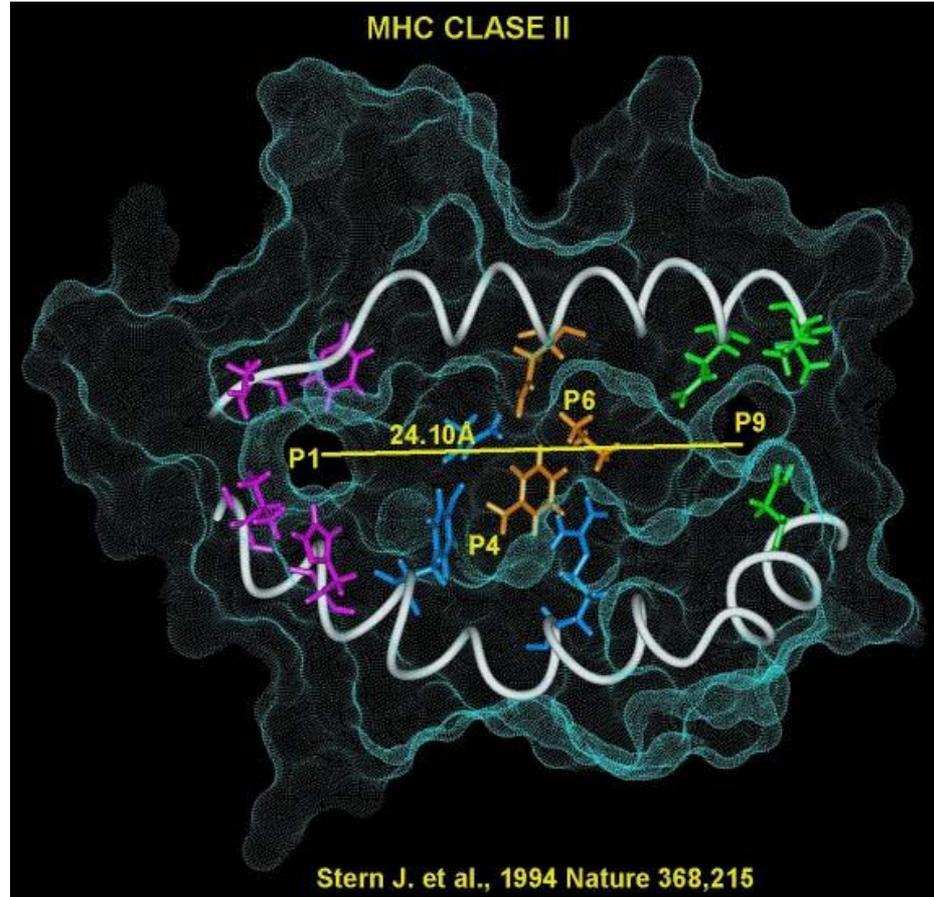
Estructura tridimensional de las moléculas MHC clase II unidas a un ligando peptídico.

Blum Js, et al 2013 Annual Review of immunology 31.443.73.

Bolsillos de unión

DRB1*0101

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y		L	A		L			
F		M	G		A			
W		A	S		I			
L		I	T		V			
I		V	C		N			
M		N	P		F			
V					Y			
A					W			



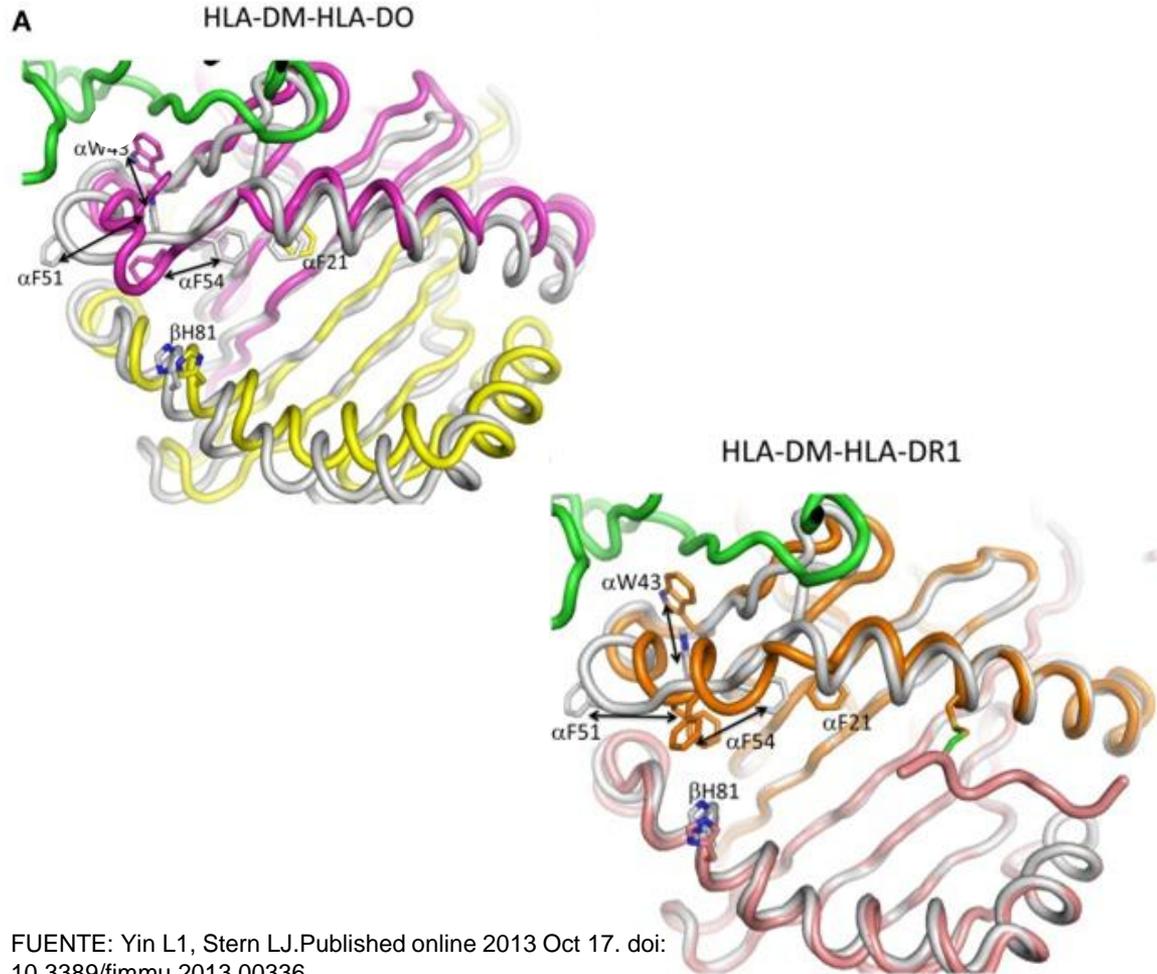
DRB1*0401

1	2	3	4	5	6	7	8	9
F			F		S			k
Y			W		T			
W			I		Q			
I			L		H			
L			V		R			
V			A					
M			D					
			E					

Molécula DM

Es la encargada de la catalización del intercambio del fragmento CLIP, la edición de péptidos y la estabilización de las moléculas MHC clase II.

- Su estructura no le permite la unión a péptidos.
- Posee un papel clave en la selección de epítopos al favorecer la presentación de péptidos con mayor estabilidad cinética



FUENTE: Yin L1, Stern LJ. Published online 2013 Oct 17. doi: 10.3389/fimmu.2013.00336

METODOLOGÍA

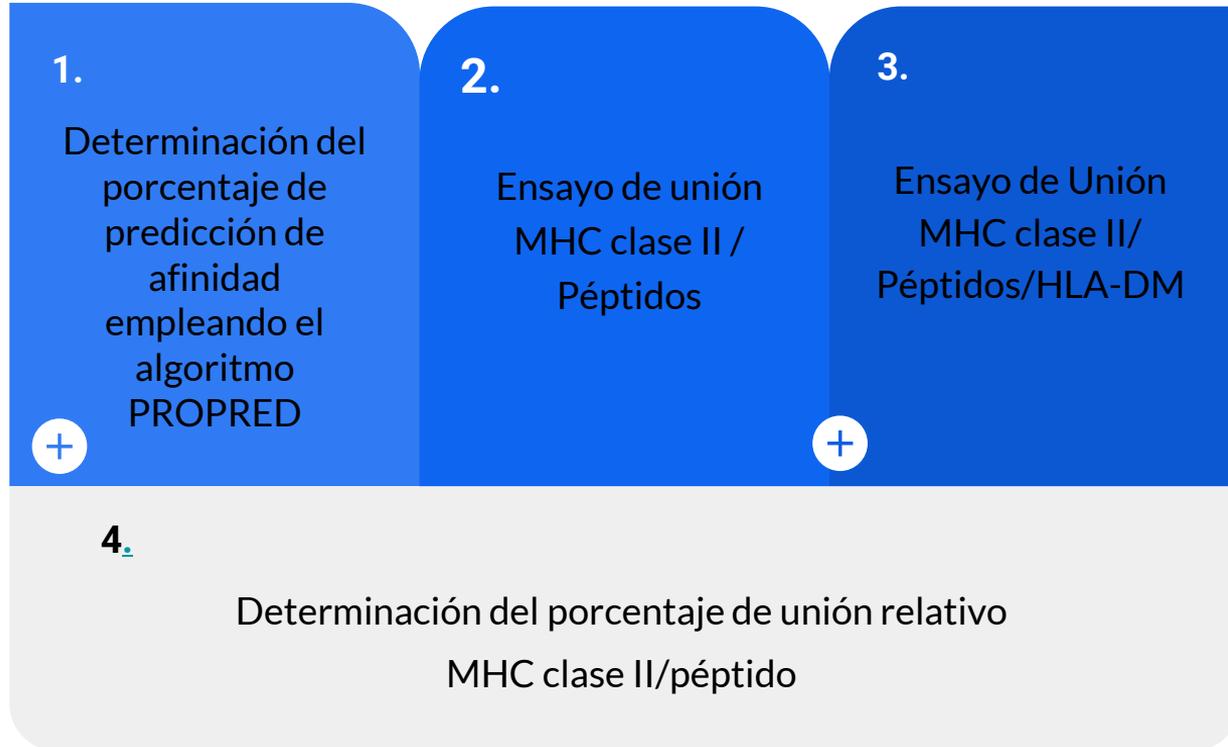


Moléculas MHC clase II y HLA-DM	<ul style="list-style-type: none">• DRB1*0101/DRB1*0401• Purificación de proteínas recombinantes en células de insecto.
Péptido control biotinilado: Hemaglutinina (HA) 306-318	<ul style="list-style-type: none">• PKYVKQNTLKLAT• Virus Influenza• Marcado en el extremo NH₃-terminal con sulfa-NHS-LC-Biotina
Péptidos del virus sincitial respiratorio	<ul style="list-style-type: none">• 8 péptidos• 15 aminoácidos cada uno• 7 de ellos determinados como péptidos de alta unión a los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4• Un control negativo

Características de los 8 péptidos del Virus Sincitial Respiratorio evaluados.

Nombre	Proteína	Localización	Peso molecular	Secuencia	Especificidad de unión
SH-50	SH/Proteína de envoltura	50-64	1830	FHNKTFELPRARVNT	Péptido de baja Unión (Negativo)
F-137	F / Proteína de fusión	137-151	1375	LGFLLGVGSAIASGI	Péptido de alta unión solo a HLA-DR1
L-962	L/ARN polimerasa	962-976	1726	LKTFNLDNIDTALT	Péptido de alta unión solo a HLA-DR4
N-298	N/Nucleoproteína	298-312	1658	AGFYHILNNPKASLL	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
L-832	L/ARN polimerasa	832-846	1738	ADYLLALNSLKLLYK	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
L-449	L/ARN polimerasa	449-463	1745	ETKFYLLSSLSMLRG	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
M-68	M/Proteína Matriz	68-82	1614	PSLRVMINSRSAVLA	Péptido de alta unión a HLA-DR1 y HLA-DR4
G1-58	G1/Glicoproteína	58-72	1641	AIIFIISANHKVTLT	Péptido de alta unión a DR1 y DR4

¿Cómo evaluar la unión de los 8 péptidos del Virus sincitial respiratorio Humano a los alelos MHC clase II: HLA -DR1 Y HLA - DR4?



Algoritmo PROPRED

Predice regiones de unión MHC clase II en una secuencia de antígeno, usando matrices cuantitativas

- Se extraen todos los marcos peptídicos nanométricos posibles a partir de la secuencia
- La suma de todos los valores específicos de posición y cadena lateral, dan como resultado un valor numérico
- Porcentaje de péptidos naturales que mejor puntúan (un umbral de 1% predecirá péptidos en cualquier secuencia).

SEQUENCE SUBMISSION FORM

Name of Antigen (Optional):

Paste your sequences here:

Or submit sequence from file :

Ningún archivo seleccionado

Input Sequence format:

Threshold (%) [1-10]:

Allele:

HLA-DRB1*0101
HLA-DRB1*0102
HLA-DRB1*0301
HLA-DRB1*0305
HLA-DRB1*0306
HLA-DRB1*0307
HLA-DRB1*0308
HLA-DRB1*0309
HLA-DRB1*0311

For multiple selection
use alt key.

Display top scorers:

Result Display Format:

Bioinformatics Center

Virtual matrices

Quantitative Matrices Used in Prediction Method

HLA-DR1 HLA-DRB1*0101 HLA-DRB1*0102	HLA-DR7 HLA-DRB1*0701 HLA-DRB1*0703	HLA-DR13 HLA-DRB1*1301 HLA-DRB1*1302 HLA-DRB1*1304 HLA-DRB1*1305 HLA-DRB1*1307 HLA-DRB1*1311 HLA-DRB1*1321 HLA-DRB1*1322 HLA-DRB1*1323 HLA-DRB1*1327 HLA-DRB1*1328
HLA-DR3 HLA-DRB1*0301 HLA-DRB1*0305 HLA-DRB1*0306 HLA-DRB1*0307 HLA-DRB1*0308 HLA-DRB1*0309 HLA-DRB1*0311	HLA-DR8 HLA-DRB1*0801 HLA-DRB1*0802 HLA-DRB1*0804 HLA-DRB1*0806 HLA-DRB1*0813 HLA-DRB1*0817	HLA-DR11 HLA-DRB1*1101 HLA-DRB1*1102 HLA-DRB1*1104 HLA-DRB1*1106 HLA-DRB1*1107 HLA-DRB1*1114 HLA-DRB1*1120 HLA-DRB1*1121 HLA-DRB1*1128
HLA-DR4 HLA-DRB1*0401 HLA-DRB1*0402 HLA-DRB1*0404 HLA-DRB1*0405 HLA-DRB1*0408 HLA-DRB1*0410 HLA-DRB1*0423 HLA-DRB1*0426	HLA-DR2 HLA-DRB1*1501 HLA-DRB1*1502 HLA-DRB1*1506	HLA-DRB5*0101 HLA-DRB5*0105

[Prediction Method](#) | [MHC and Prediction Algorithms](#) | [Help](#) | [Virtual matrices](#) | [Related Links](#) | [ProPred Team](#)

MHC Class-II Binding Peptide Prediction Results

[HELP](#)[HOME](#)[MHC & Prediction Algorithm](#)

INPUT & PARAMETER INFORMATION

Antigen Name	L-962
Scanned on	Mon Oct 22 04:16:16 2018
Length of input sequence	15 amino acids
Number of nanomers from input sequence	7
Number of nanomers with obligatory P1 anchor residue	4
Threshold setting	1
Number of alleles in query	1

Subsequence Analysis from till OR

-----10-----

DRB1_0101: LKTFNLDNIDTALT

[GRAPHICAL DISPLAY](#) [Sorted Binding Regions](#)

MHC Class-II Binding Peptide Prediction Results

[HELP](#)[HOME](#)[MHC & Prediction Algorithm](#)

INPUT & PARAMETER INFORMATION

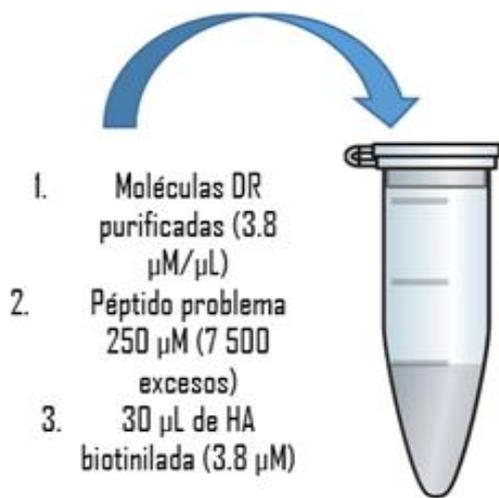
Antigen Name	f-137
Scanned on	Tue Oct 9 04:33:05 2018
Length of input sequence	15 amino acids
Number of nanomers from input sequence	7
Number of nanomers with obligatory P1 anchor residue	5
Threshold setting	1
Number of alleles in query	1
Number of top scorers to be displayed	1

ALLELE: DRB1_0101 Threshold for 1 % with score: 1.24 Highest Score achievable by any peptide: 6

Rank	Sequence	At Position	Score	% of Highest Score
1	FLLGVGSAI	2	1.5000	25.00

Marco peptídico

Puntuación de marco peptídico



Incubar 72 horas a 37° C.

4. 50 μL de anti DR 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LB 3.1)
Dejar reaccionar O/N a 4°C

★
Bloquear con BSA al 0.25% en PBS IX
★

★
Incubar 2 horas a temperatura ambiente

5. 60 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de la solución del complejo HLA-DR/péptido



6. 50 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de streptavidin fosfatasa dilución 1/500

1 hora a temperatura ambiente.

★
7. 200 μL de la solución el P-Nitrofenilfosfato

Dejar desarrollar color a 37°C durante al menos 1 hora.

8. Leer en lector de ELISA a 415 nm.

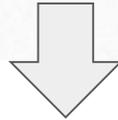
★ Lavar 3 veces con PBS IX y Tween 20 al 0.05%

$(OD R1 + OD R2) / 2 = \text{Valor promedio de cada reacción}$



$(OD \text{ Control positivo} - OD \text{ Blanco}) = OD \text{ CP1}$

$(OD \text{ Reacción de cada péptido evaluado} - OD \text{ Blanco}) = OD p$



Determinación del porcentaje de unión relativo MHC clase II/péptido

OD: Densidad óptica

R: Reacción

OD CP1: Densidad óptica control positivo 1

OD p: Densidad óptica péptido evaluado

$\text{unión de HA biotinilada} = (OD p * 100 \% \text{ de unión}) / OD \text{ CP1}$
 $\% \text{ de unión del péptido} = (100 - \% \text{ de unión de HA biotinilada})$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del porcentaje de afinidad de los péptidos SH-50, F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58 a las moléculas HLA-DRB1* 0101 y HLA-DRB1*0401 empleando el algoritmo PROPRED.

Valores de predicción de afinidad de los péptidos evaluados al alelo HLA-DRB1* 0101 empleando el algoritmo PROPREL

Péptido	Secuencia "core"	Puntuación marco peptídico	% de puntuación marco peptídico normalizado respecto a HA
HA	Y VK Q NT L KL L	1.8	100
SH-50	-	0	0
F-137	F LL G V G SA I	1,5	83
L-962	F FN L D N ID T	1,5	83
N-298	Y HI L NN P KA A	2,1	120
L-832	L LA L NS L KL L	1,1	61
L-449	F YL L SS L SM M	2,5	143
M-68	L RV M IN S RS S	0,9	50
G1-58	F I S AN H HK V	1,2	67

-Secuencia mínima de interacción con las moléculas MHC clase II

-Residuos aromáticos voluminosos tales como F o Y, favorecen la interacción del péptido en la posición 1

-MHC clase II: Glicina en la posición 86 de la cadena Beta, y arreglo estructural generan un bolsillo profundo, predominantemente hidrofóbico.

*L J Stern et al.
Marsh et al.
Rammensee, H G*

Valores de predicción de afinidad de los péptidos evaluados al alelo HLA-DRB1* 0401 empleando el algoritmo PROPRE

Péptido	Secuencia "core"	Puntuación marco peptídico	% de puntuación marco peptídico normalizado respecto a HA
HA	Y VK Q N T LKL L	4,5	100
SH-50	-	0	0
F-137	L GF L L G V G S	0,38	8
L-962	F N L D N I D T A	2,8	62
N-298	Y H I L N N P K A	3,7	82
L-832	Y LL A L N SL K	2,8	62
L-449	F YLL S S LS M	4	89
M-68	L RV M I N SR S	4,4	98
G1-58	F I S A N HK V	4	89

Residuo de anclaje al bolsillo 1 es clave para la unión MHC II/Péptido.

Vargas L.E. et al 2003
Marek Wieczorek 2017

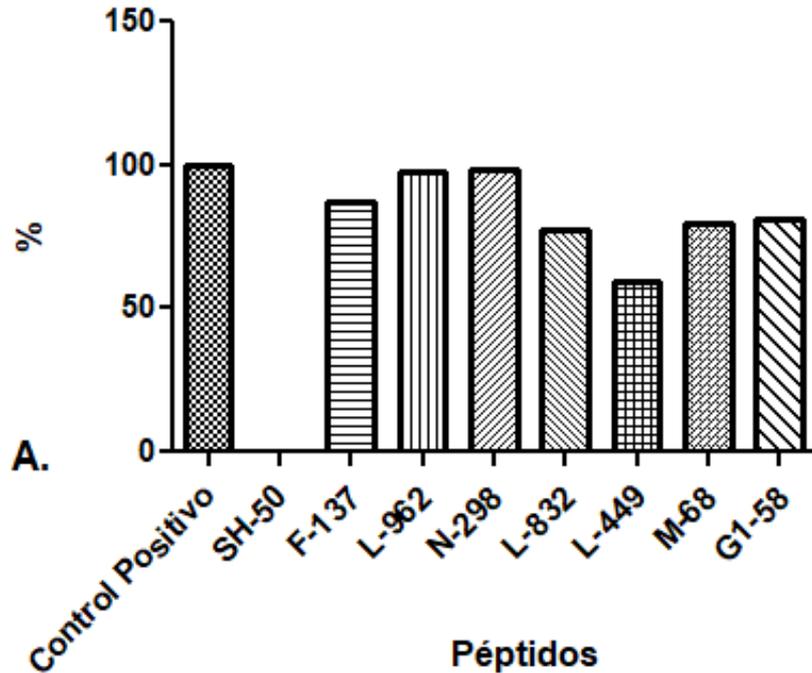
Hay otros pequeños bolsillos 4, 6, 7 y 9 dentro del sitio de unión del péptido que juegan un papel importante en la estabilización o desestabilización del complejo.

"Susceptibility to HLA-DM Protein Is Determined by a Dynamic Conformation of Major Histocompatibility Complex Class II Molecule Bound with Peptide." Journal of Biological Chemistry"
Yin, Liusong et al. 2014

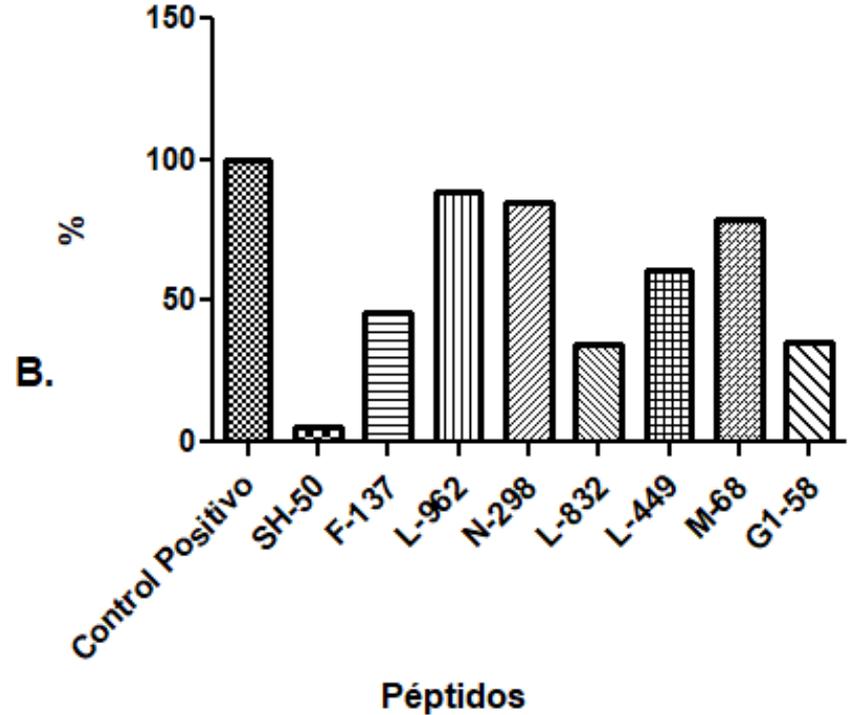
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación experimental de los porcentajes de unión relativos de péptidos del VSRh a moléculas HLA-DR1 Y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM

% de unión relativo: HLA- DR1/Péptidos

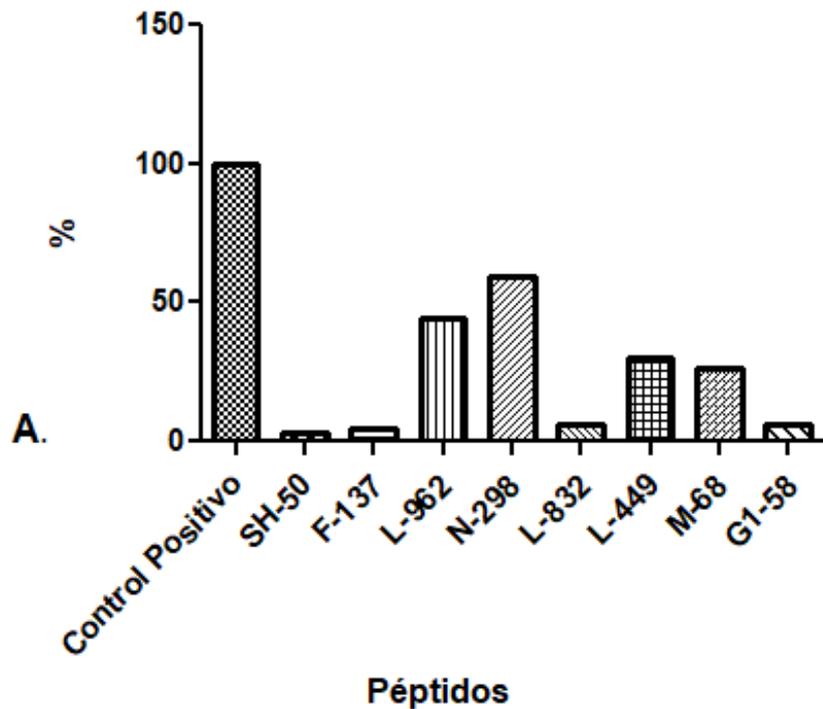


% de unión relativo: HLA- DR4/Péptidos

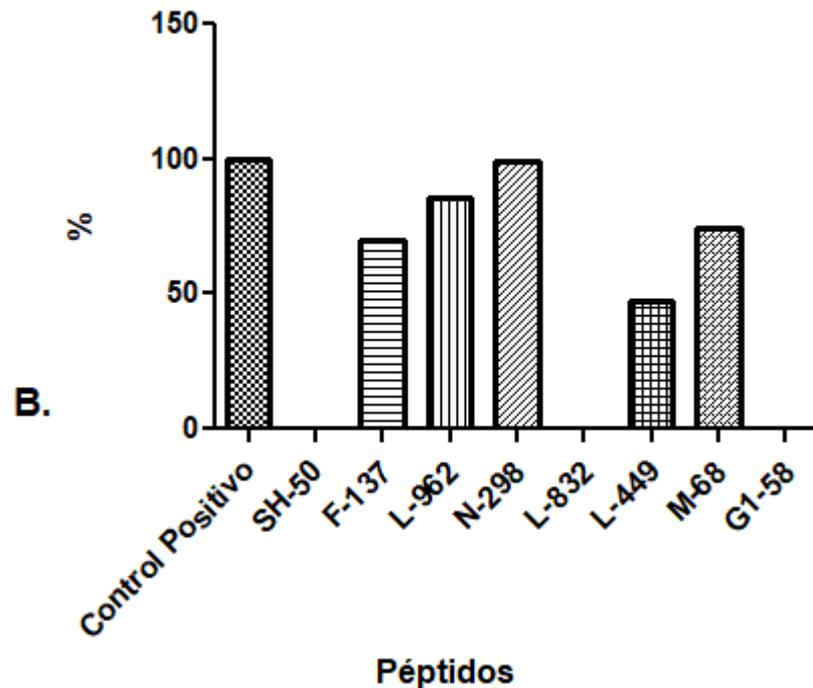


Determinación del porcentaje de unión relativo HLA-DR1 HLA-DR4 /péptido

% de unión relativo: HLA- DR1/Péptidos/DM



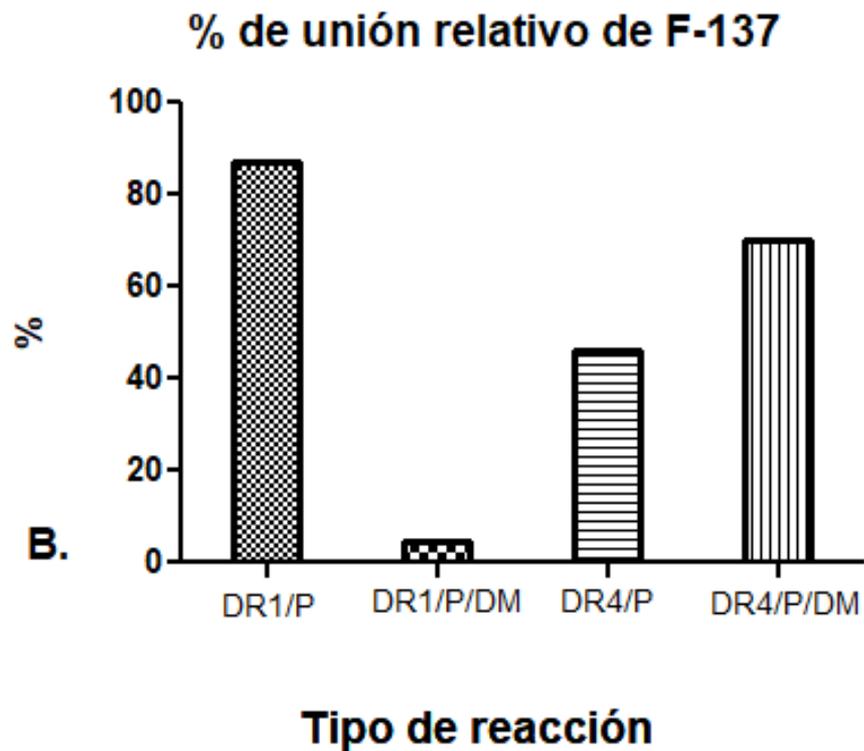
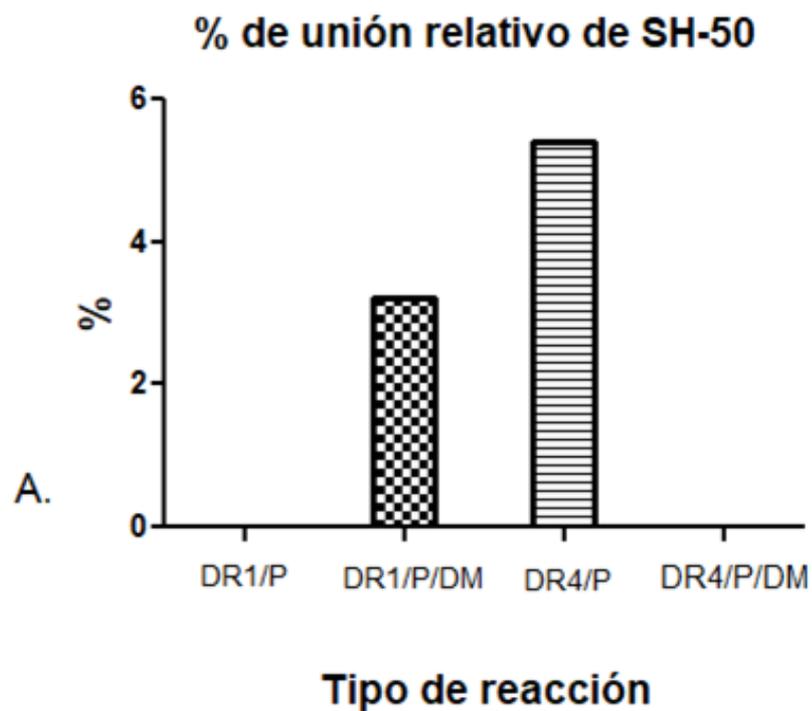
% de unión relativo: HLA- DR4/Péptido/DM



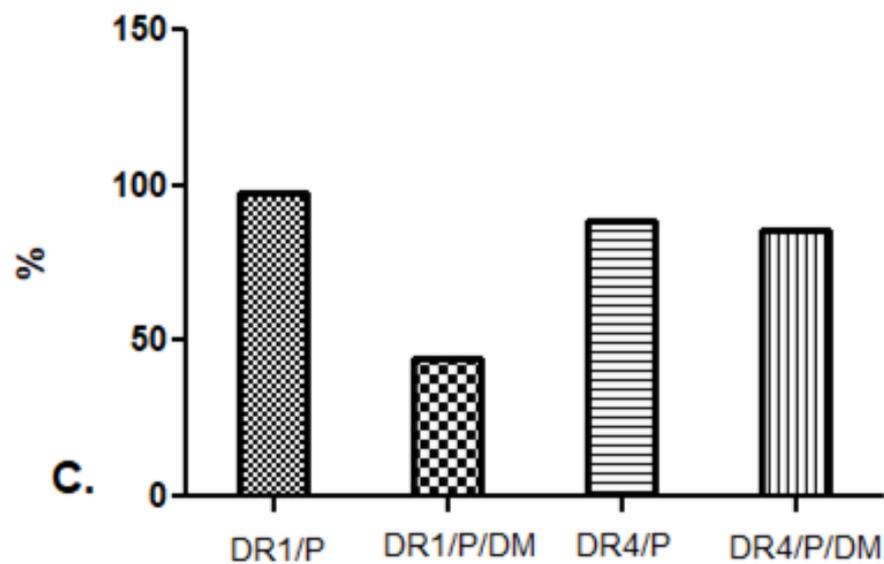
Determinación del porcentaje de unión relativo HLA DR1- HLA DR4/péptido/HLA-DM

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación del porcentaje de unión de cada péptido con HLA-DR1 y HLA-DR4 en presencia y ausencia de HLA-DM

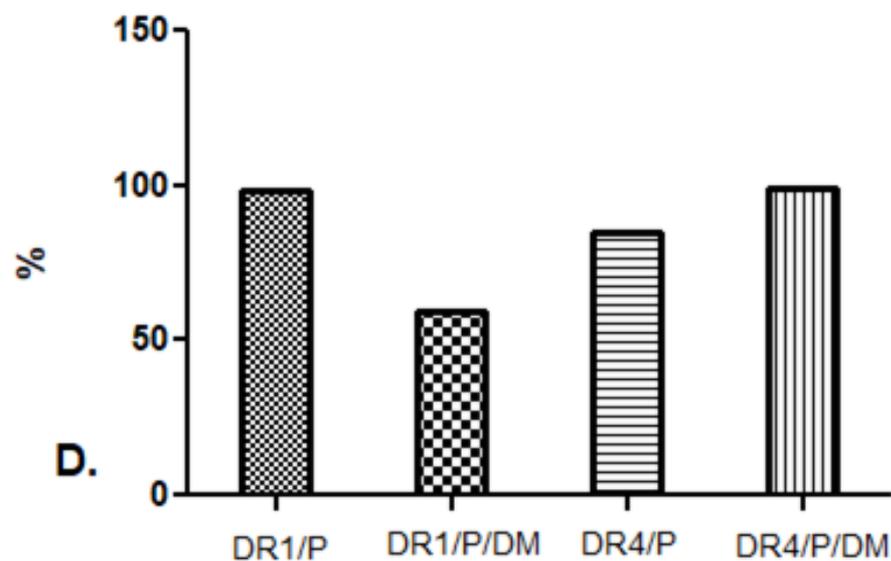


% de unión relativo de L-962



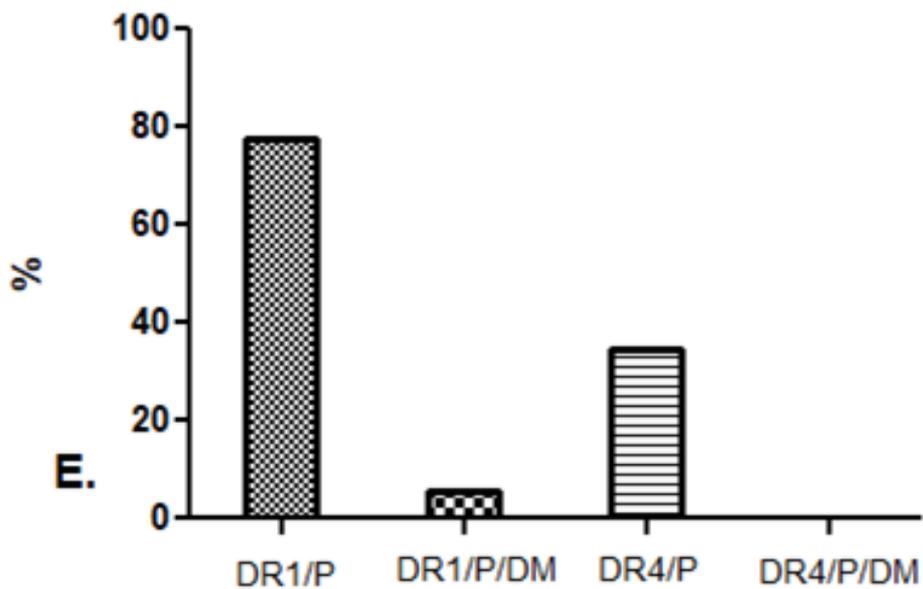
Tipo de reacción

% de unión relativo de N-298



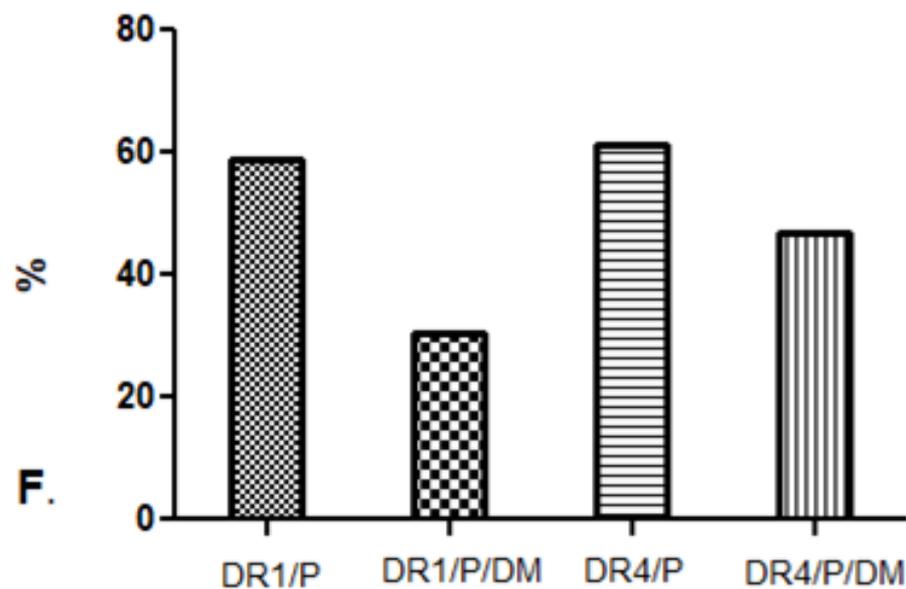
Tipo de reacción

% de unión relativo de L-832



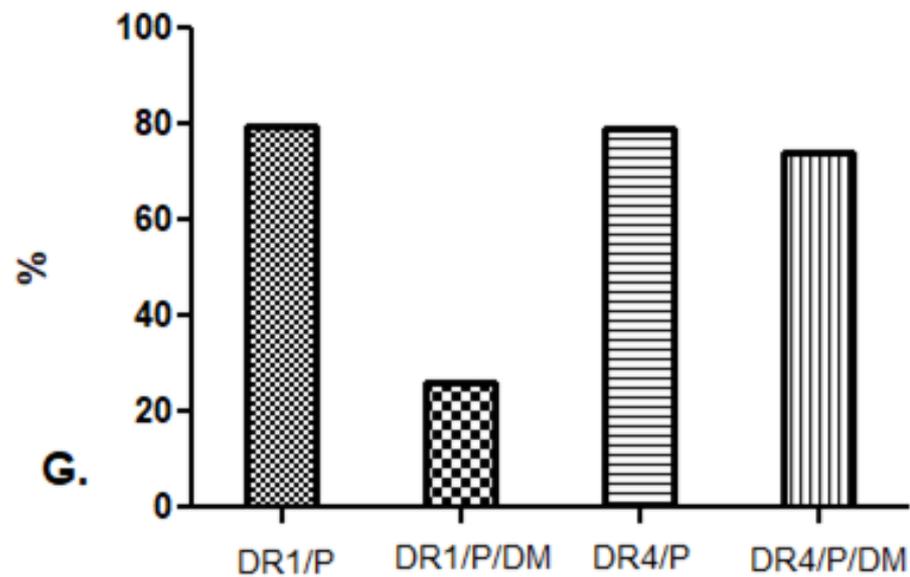
Tipo de reacción

% de unión relativo de L-449



Tipo de reacción

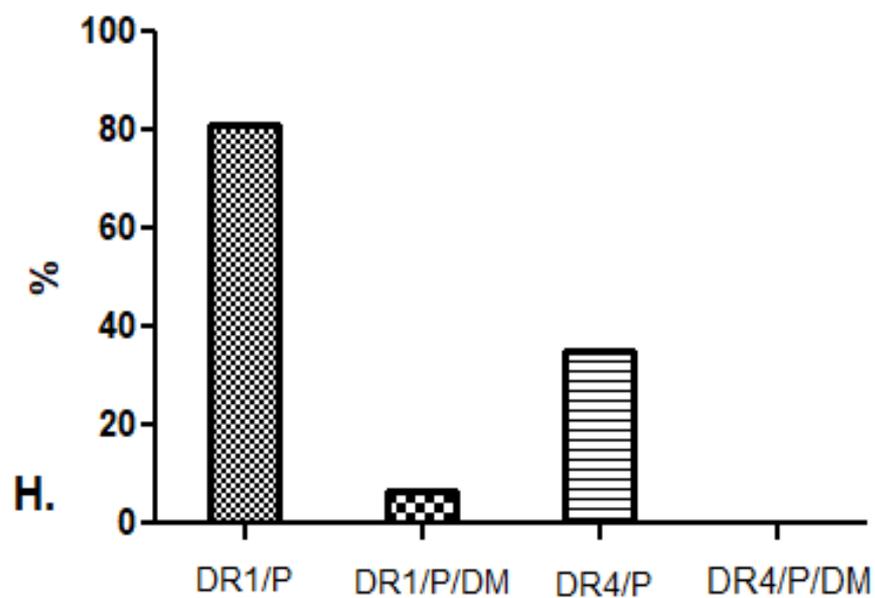
% de unión relativo de M-68



G.

Tipo de reacción

% de unión relativo de G1-58



H.

Tipo de reacción

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La modulación negativa de HLA-DM observada sobre la mayoría de los péptidos evaluados incluyendo el control puede estar relacionada con el pH al cual se realizó la reacción (pH 7,7)

Hall, Frances et al. 2002.

Hasta ahora los programas desarrollados no presentan confiabilidad del 100%, no obstante, se demuestra que PROPRED es un buen algoritmo predictor.

Lin, Hong Huang et al 2008

El umbral de astringencia escogido es crítico en la obtención de verdaderos positivos.

Falsos positivos (50%) / Falsos negativos (6%)

PROPRED tiene en cuenta la interacción fisicoquímica del péptido con la molécula HLA-DR

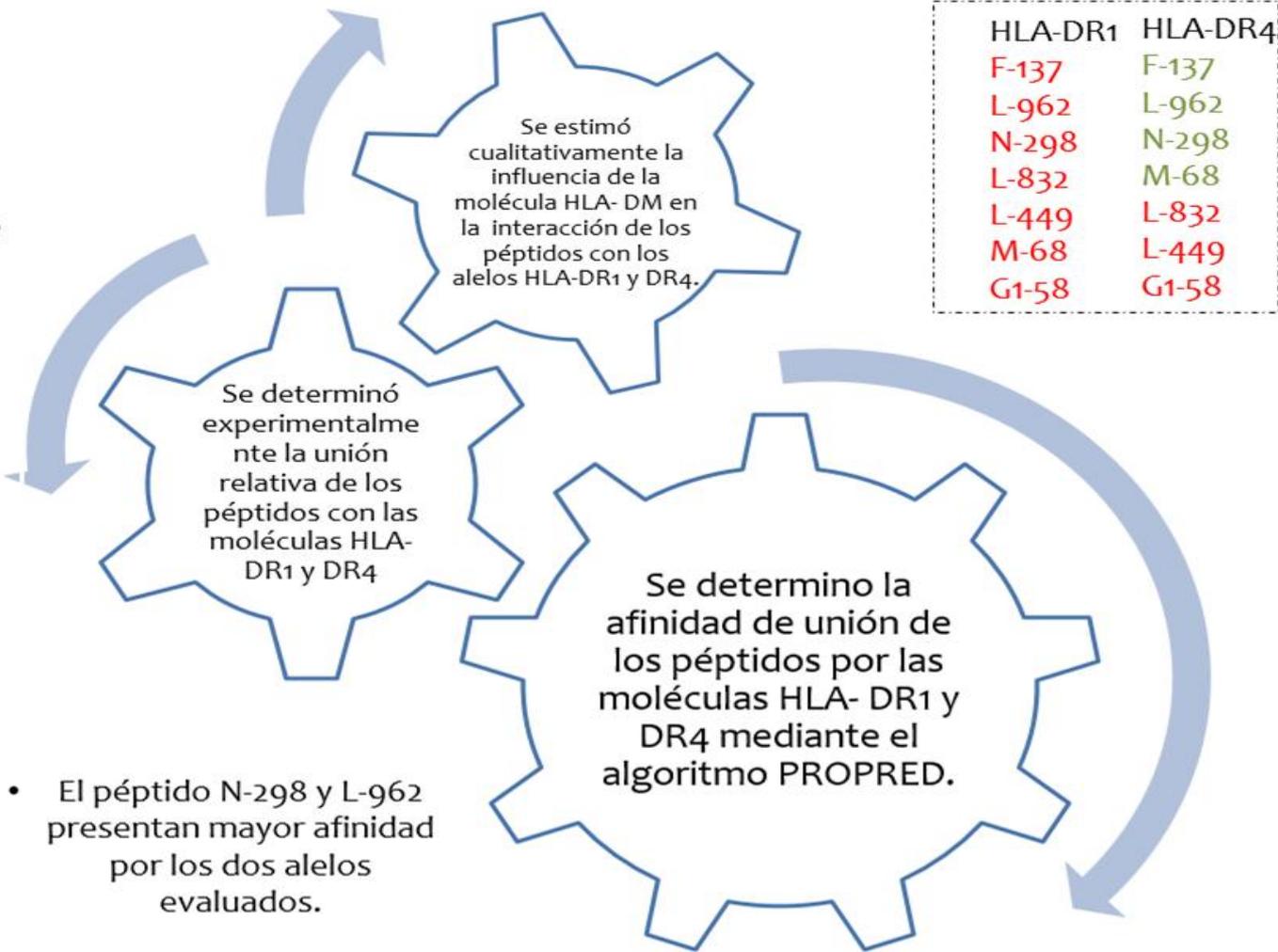
Es necesario tener en cuenta el efecto de la molécula HLA-DM en esta interacción **Achal Pashine et al 2003. Lawrence J Stern. 2011**

SH-50 / HLA-DR1 Y L-832, G1-58 y SH-50 con HLA-DR4 en presencia de HLA-DM :
Porcentajes de unión negativos

Moléculas pequeñas pueden llegar a modular la formación del complejo HLA-DR/péptido de manera análoga a HLA-DM.

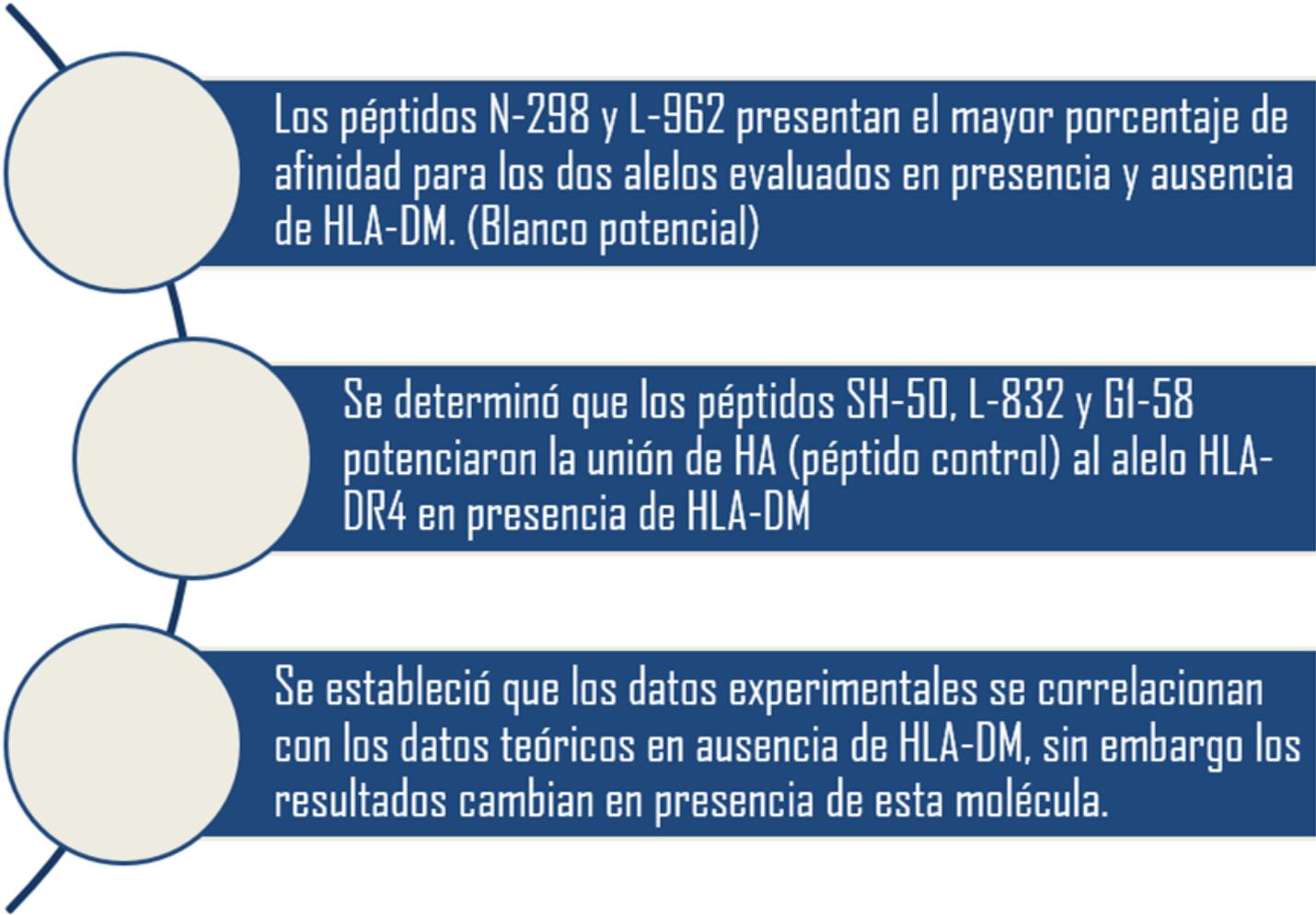
Analogues of HLA-DM Can Induce a Peptide-receptive State in HLA-DR Molecules. Viviana Marin-Esteban, Kirsten Falk, Chemical, 2004

- Los péptidos N-298 y L-449 presentan los mayores porcentajes de afinidad para los dos alelos evaluados.
- Se comprobó la deficiente capacidad de unión que tiene el péptido SH-50 (-5.4%).



HLA-DR1	HLA-DR4
F-137	F-137
L-962	L-962
N-298	N-298
L-832	M-68
L-449	L-832
M-68	L-449
G1-58	G1-58

- El péptido N-298 y L-962 presentan mayor afinidad por los dos alelos evaluados.

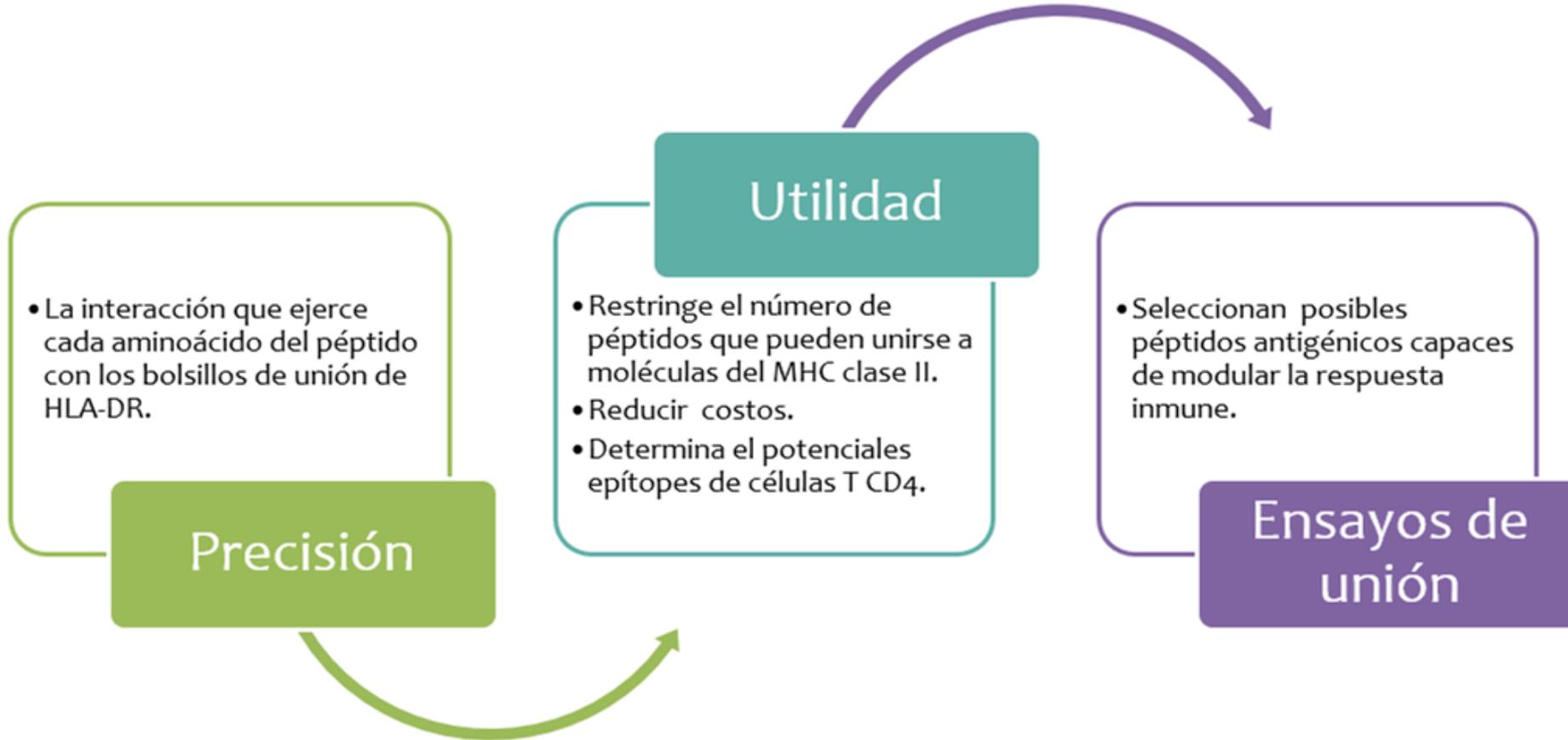


Los péptidos N-298 y L-962 presentan el mayor porcentaje de afinidad para los dos alelos evaluados en presencia y ausencia de HLA-DM. (Blanco potencial)

Se determinó que los péptidos SH-50, L-832 y GI-58 potenciaron la unión de HA (péptido control) al alelo HLA-DR4 en presencia de HLA-DM

Se estableció que los datos experimentales se correlacionan con los datos teóricos en ausencia de HLA-DM, sin embargo los resultados cambian en presencia de esta molécula.

Algoritmos de predicción



PROYECCIONES

- Evaluar la unión de los péptidos teniendo en cuenta valores de IC50
- Evaluar estabilidad cinética del complejo MHC/Péptido
- Determinar la tasa de disociación y la vida media de unión con los alelos HLA-DR
- Estudios in vivo de la capacidad antigénica de los péptidos
- Respuesta de linfocitos T
- Producción de citoquinas.