



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

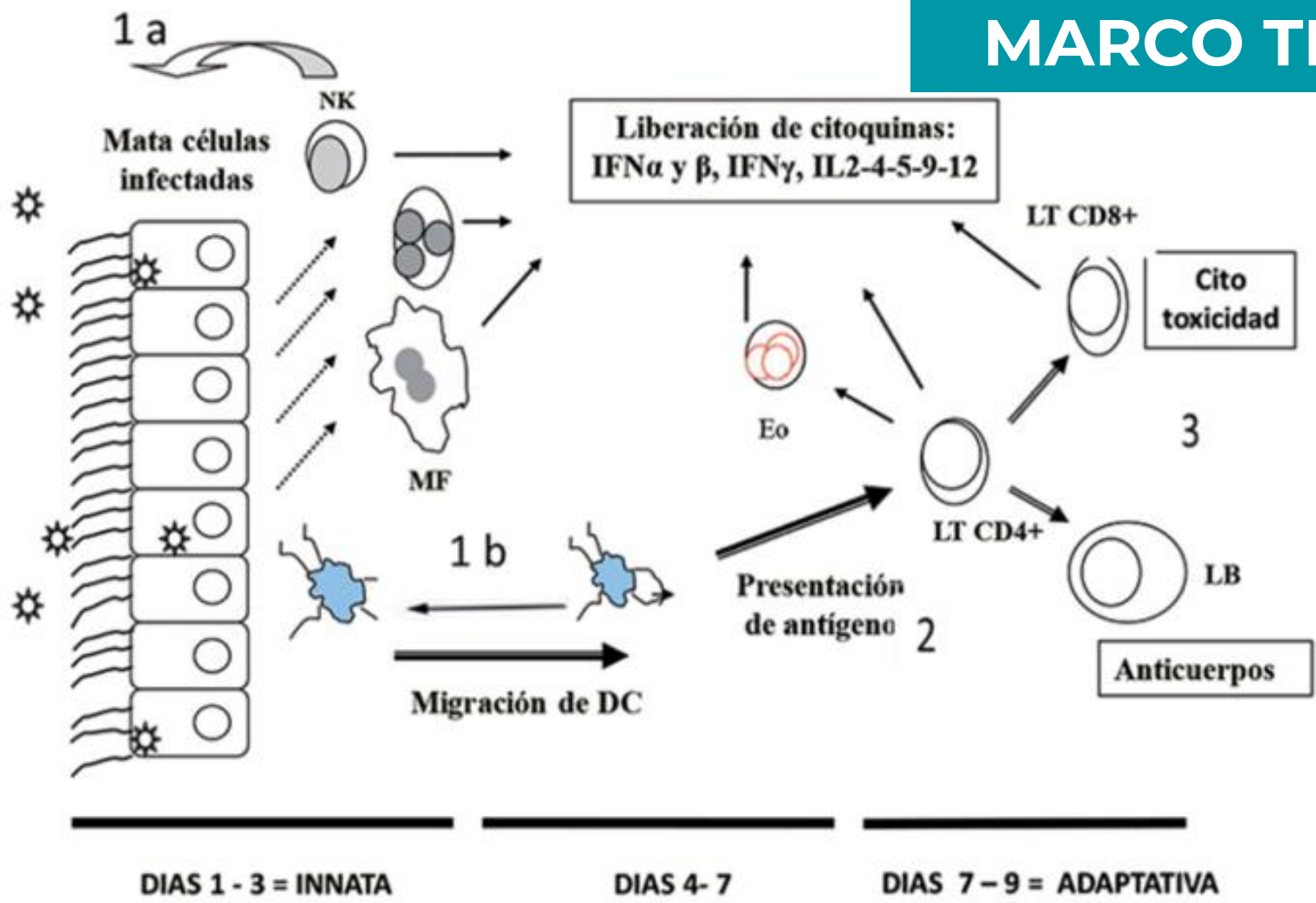
## 1. OBJETIVO GENERAL

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

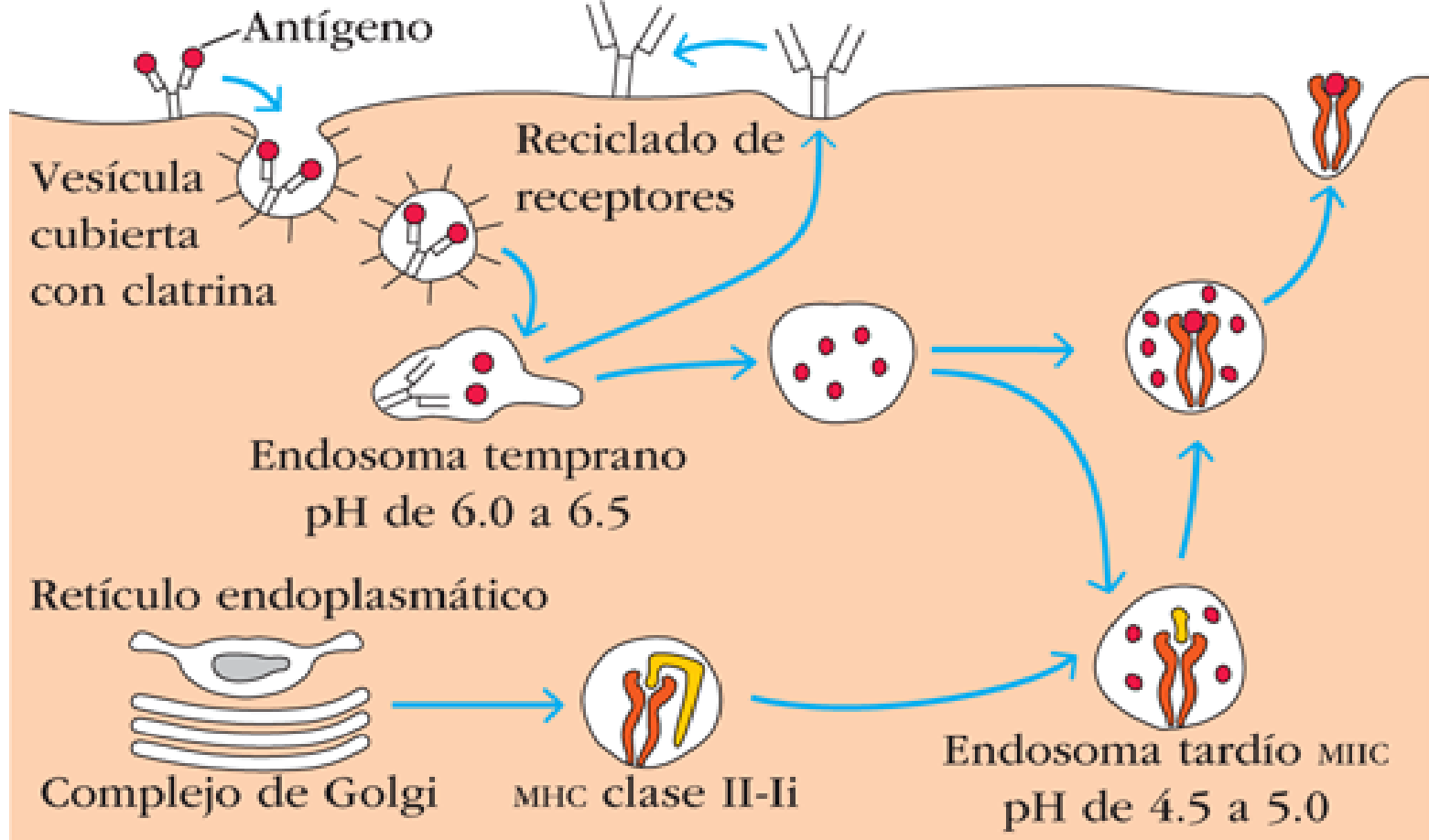
- Predecir valores de afinidad de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58, SH-50 por las moléculas HLA- DR1 y HLA-DR4 mediante el empleo del algoritmo PROPRED.
- Determinar experimentalmente el porcentaje de unión relativo de los péptidos F-137, L-962, N-298, L-832, L-449, M-68, G1-58,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

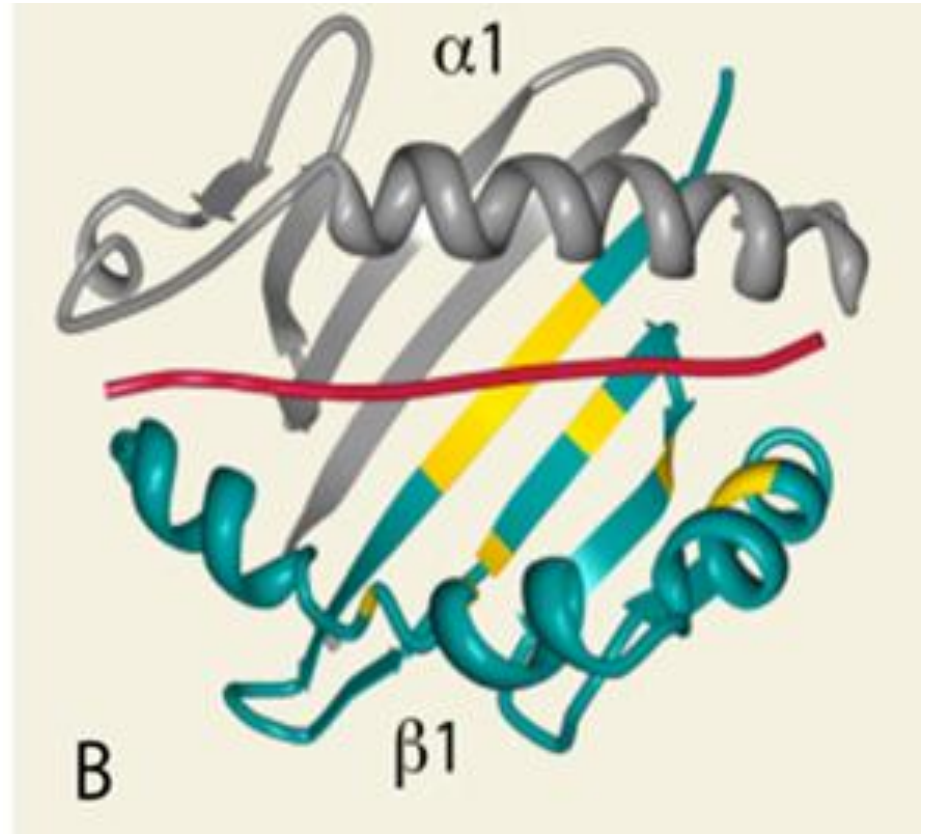
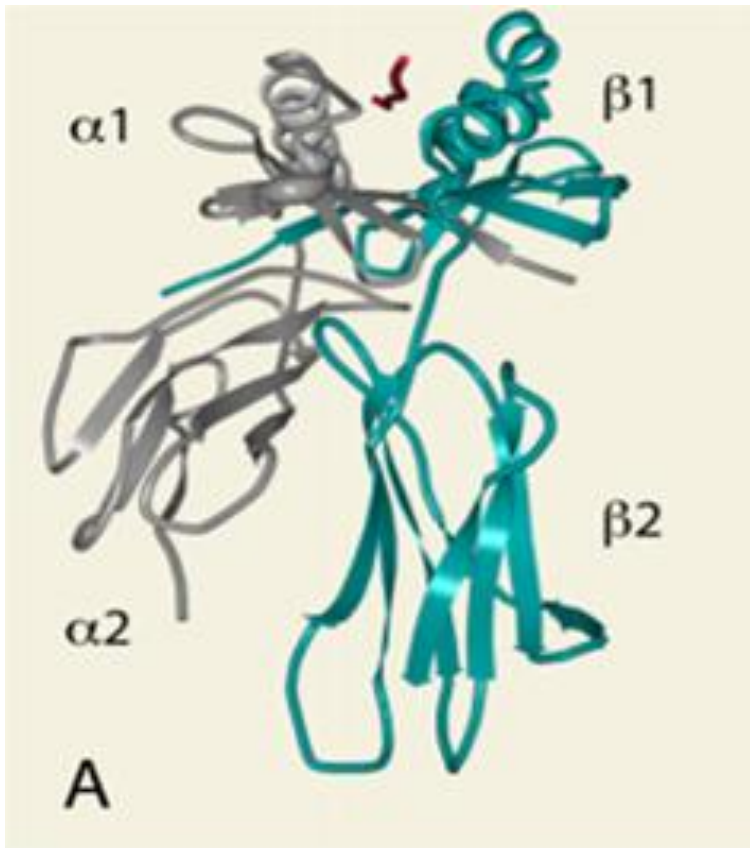


Rev. chil. enferm. respir. vol.33 no.4 Santiago dic. 2017

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



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



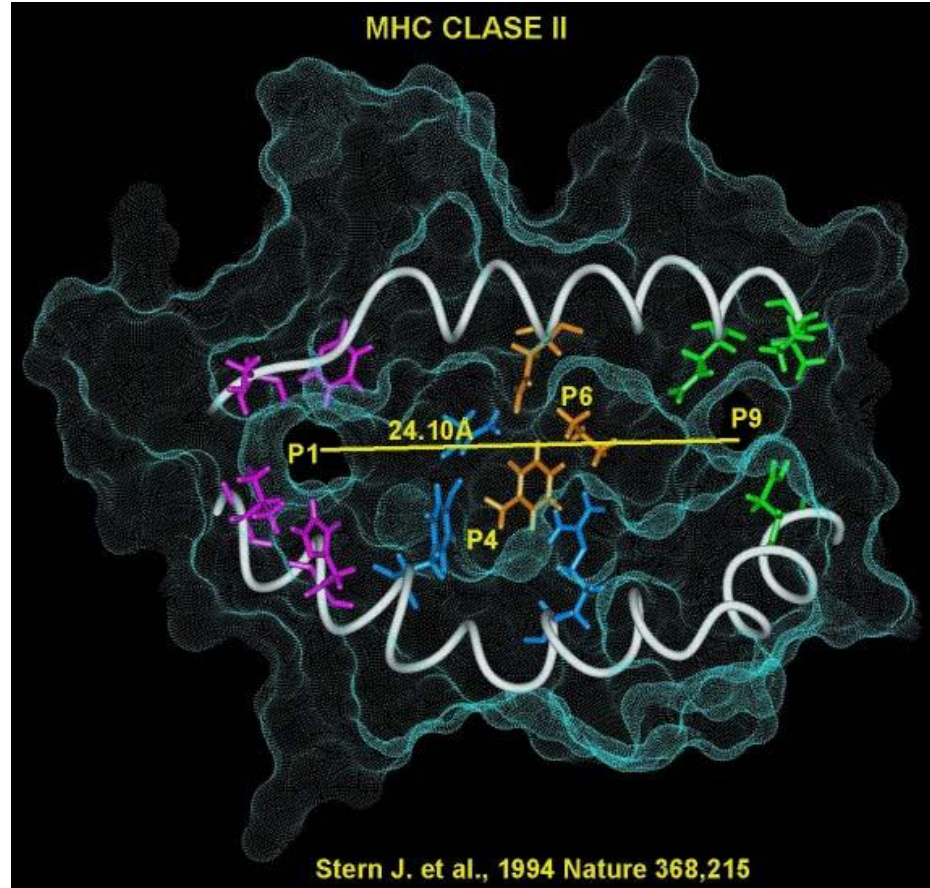
**Estructura tridimensional de las moléculas MHC clase II unidas a un ligando peptídico.**

*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

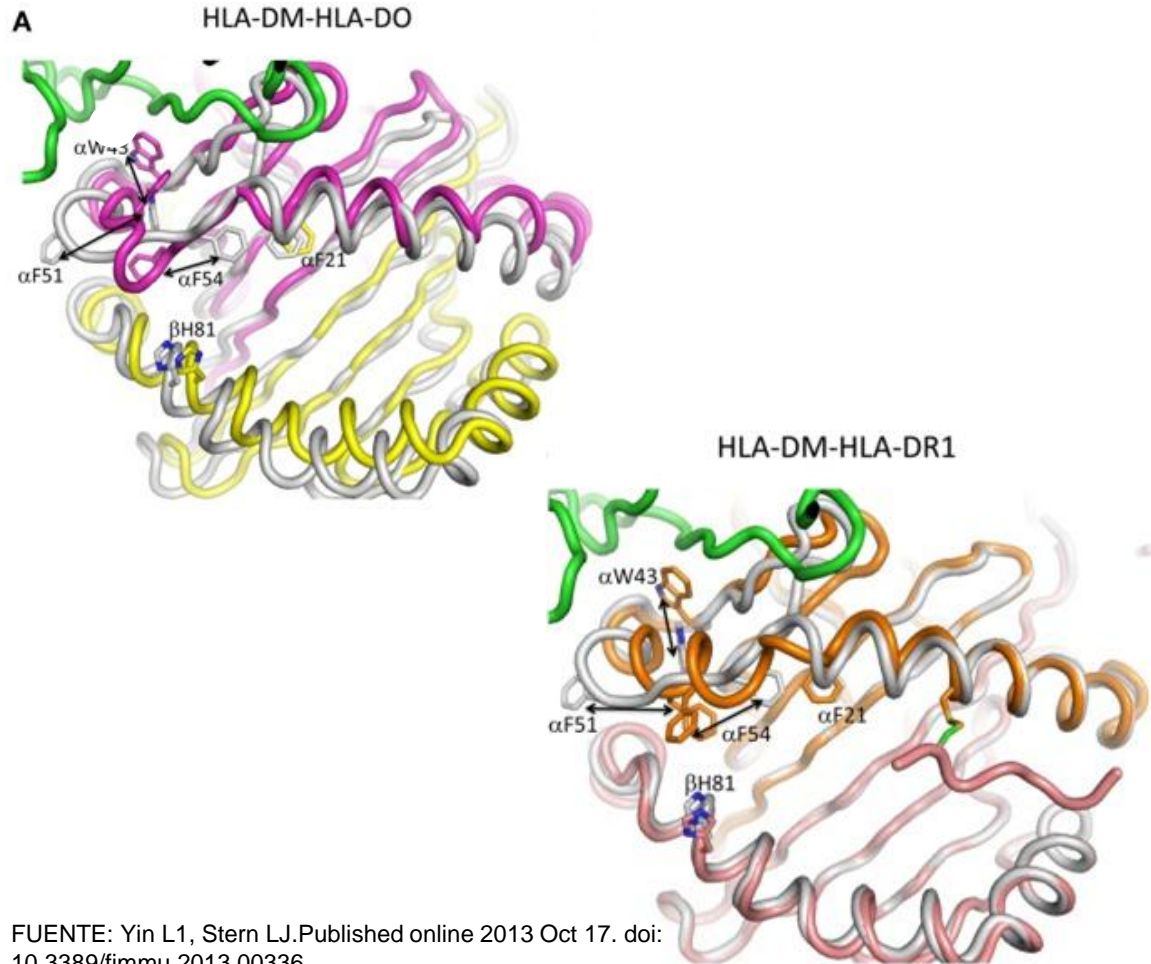
1	2	3	4	5	6	7	8	9
F			F		S			k
Y			W		T			
W			I		Q			
I			L		H			
L			V		R			
V			A					
M			D					
			E					



# 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

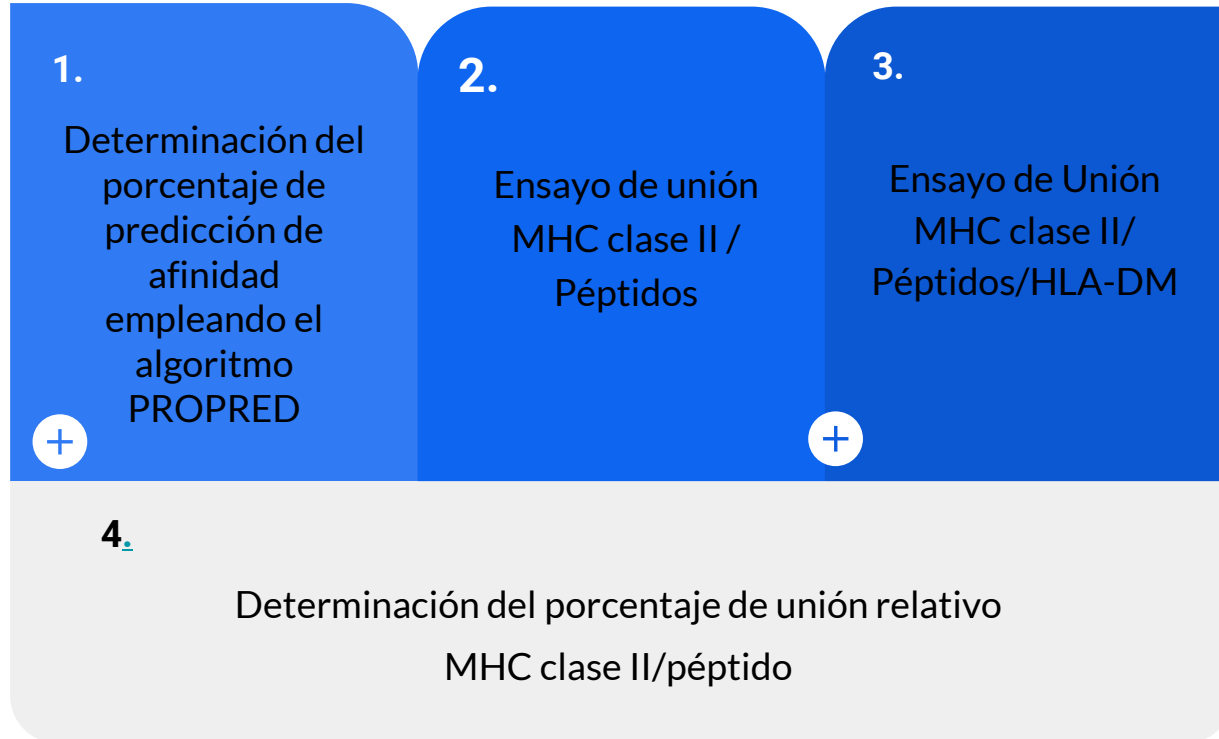


<b>Moléculas MHC clase II y HLA-DM</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• DRB1*0101/DRB1*0401</li><li>• Purificación de proteínas recombinantes en células de insecto.</li></ul>
<b>Péptido control biotinilado: Hemaglutinina (HA) 306-318</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• PKYVKQNTLKLAT</li><li>• Virus Influenza</li><li>• Marcado en el extremo NH<sub>3</sub>-terminal con sulfa-NHS-LC-Biotina</li></ul>
<b>Péptidos del virus sincitial respiratorio</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 8 péptidos</li><li>• 15 aminoácidos cada uno</li><li>• 7 de ellos determinados como péptidos de alta unión a los alelos HLA-DR1 y HLA-DR4</li><li>• Un control negativo</li></ul>

## 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

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

[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 <a href="#">obligatory P1 anchor residue</a>	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 <a href="#">obligatory P1 anchor residue</a>	5
Threshold setting	1
Number of alleles in query	1
Number of top scorers to be displayed	1

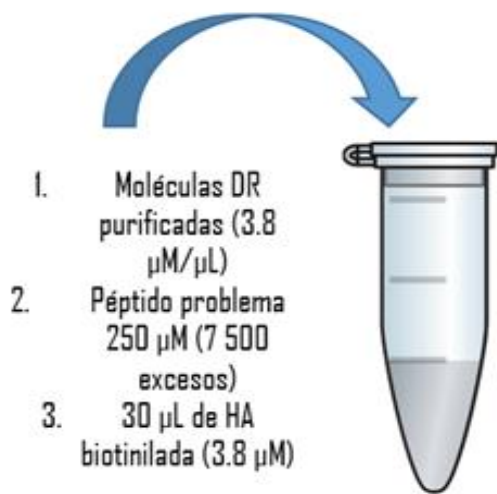
ALLELE: DRB1\_0101 Threshold for 1 % with score: 1.24 Highest Score achievable by any peptide: 6

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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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.

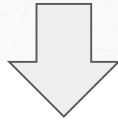
★ Lavar 3 veces con PBS IX y Tween 20 al 0.05%

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



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

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



## 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 PROPPRED.**

# 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	<b>Y</b> VK <b>Q</b> NT <b>L</b> KL <b>L</b>	1.8	100
SH-50	-	0	0
F-137	<b>F</b> LL <b>G</b> V <b>G</b> SA <b>I</b>	1,5	83
L-962	<b>F</b> FN <b>L</b> D <b>N</b> ID <b>T</b>	1,5	83
N-298	<b>Y</b> HI <b>L</b> NN <b>P</b> KA <b>A</b>	2,1	120
L-832	<b>L</b> LA <b>L</b> NS <b>L</b> KL <b>L</b>	1,1	61
L-449	<b>F</b> YL <b>L</b> SS <b>L</b> SM <b>M</b>	2,5	143
M-68	<b>L</b> RV <b>M</b> IN <b>S</b> RS <b>S</b>	0,9	50
G1-58	<b>F</b> I <b>S</b> AN <b>H</b> KV <b>V</b>	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	<b>Y</b> VK <b>Q</b> NT <b>L</b> KL <b>L</b>	4,5	100
SH-50	-	0	0
F-137	<b>L</b> GF <b>L</b> L <b>G</b> V <b>G</b> S <b>S</b>	0,38	8
L-962	<b>F</b> N <b>L</b> <b>D</b> N <b>I</b> D <b>T</b> A <b>A</b>	2,8	62
N-298	<b>Y</b> H <b>I</b> L <b>N</b> <b>N</b> PK <b>A</b>	3,7	82
L-832	<b>Y</b> LL <b>A</b> L <b>N</b> SL <b>K</b>	2,8	62
L-449	<b>F</b> YLL <b>S</b> S <b>L</b> SL <b>M</b>	4	89
M-68	<b>L</b> RV <b>M</b> IN <b>S</b> RS <b>S</b>	4,4	98
G1-58	<b>F</b> I <b>S</b> AN <b>H</b> HK <b>V</b>	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**

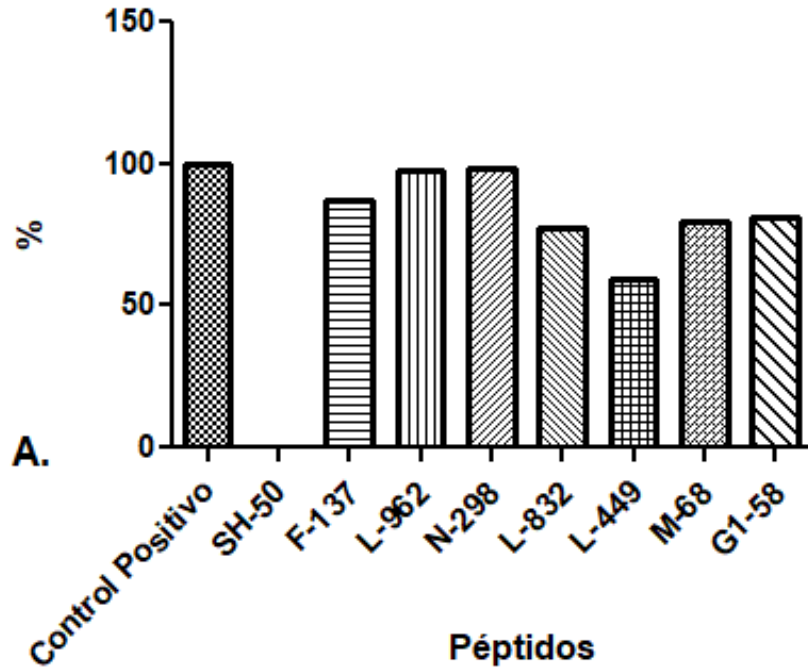
Hay otros pequeños bolsillos 4, 6, 7 y 9 dentro del sitio de unión del péptido que juegan un papel importante en la estabilización o desestabilización del complejo.

*"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**

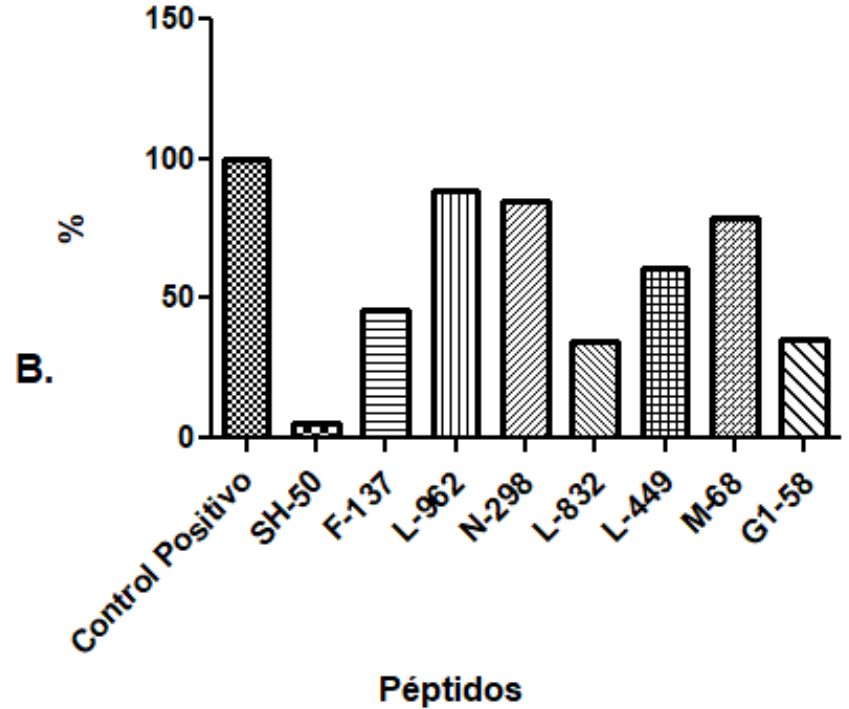
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**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

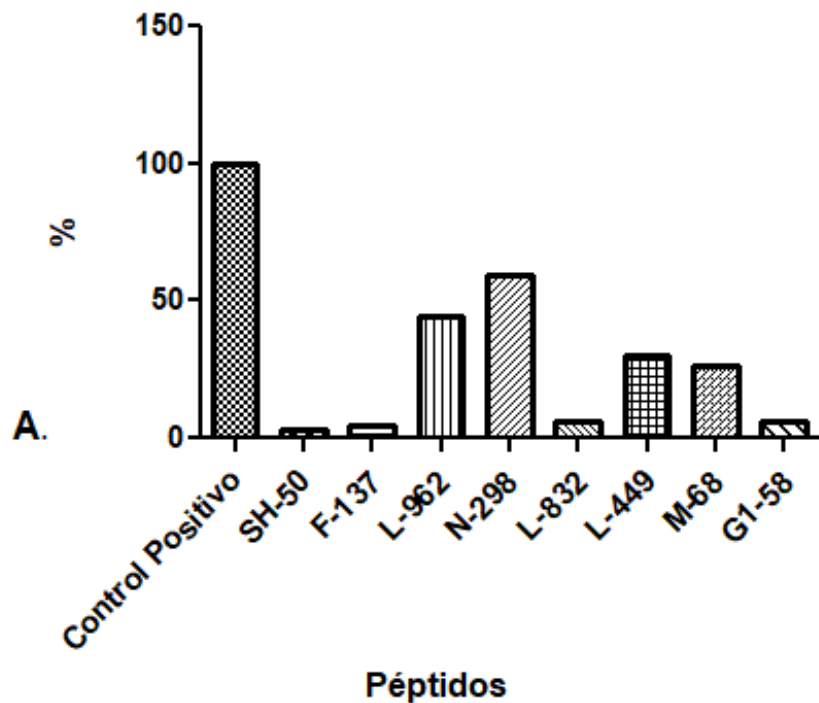


% de unión relativo: HLA- DR4/Péptidos

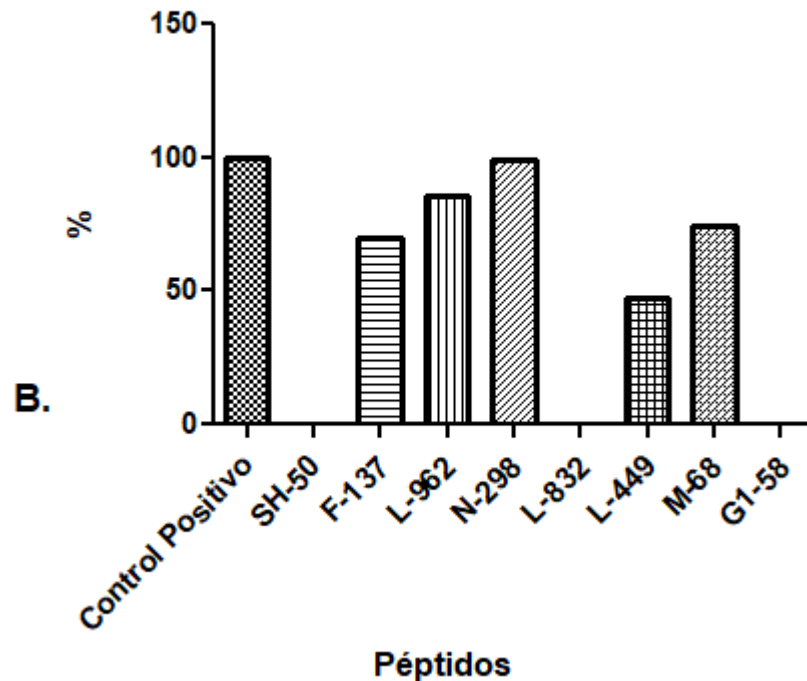


Determinación del porcentaje de unión relativo HLA-DR1 HLA-DR4 /péptido

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



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

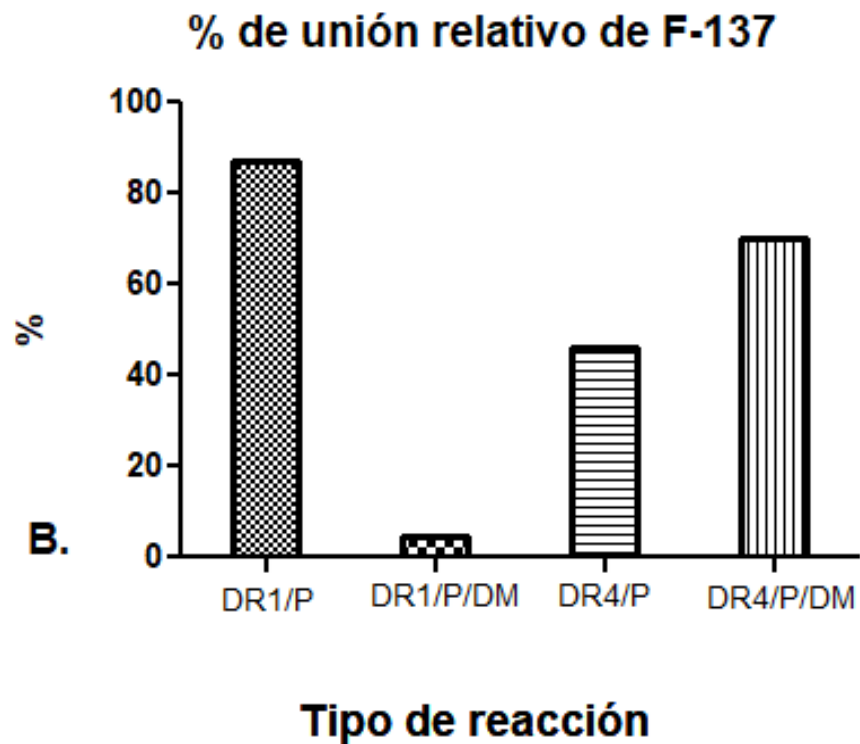
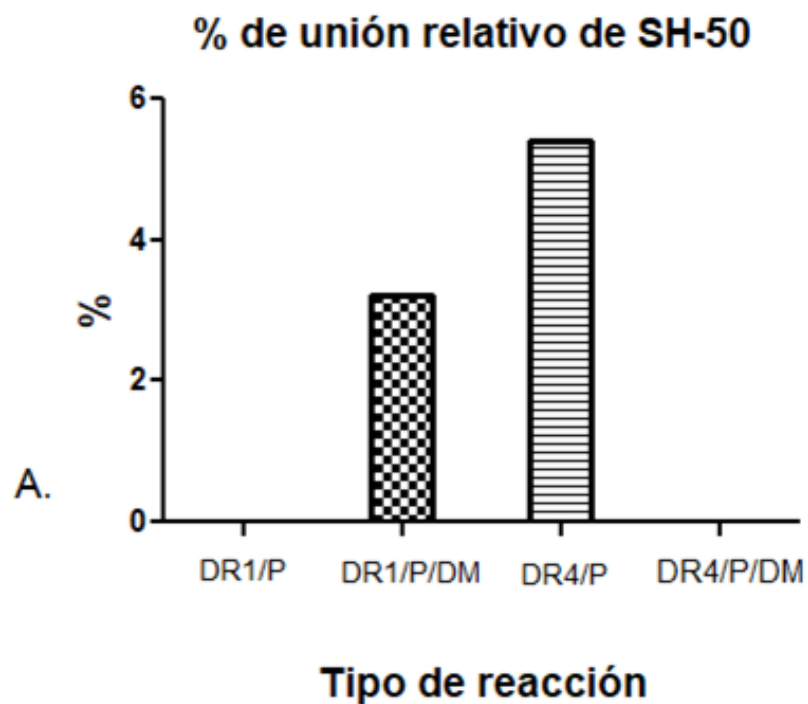


Determinación del porcentaje de unión relativo HLA DR1- HLA DR4/péptido/HLA-DM

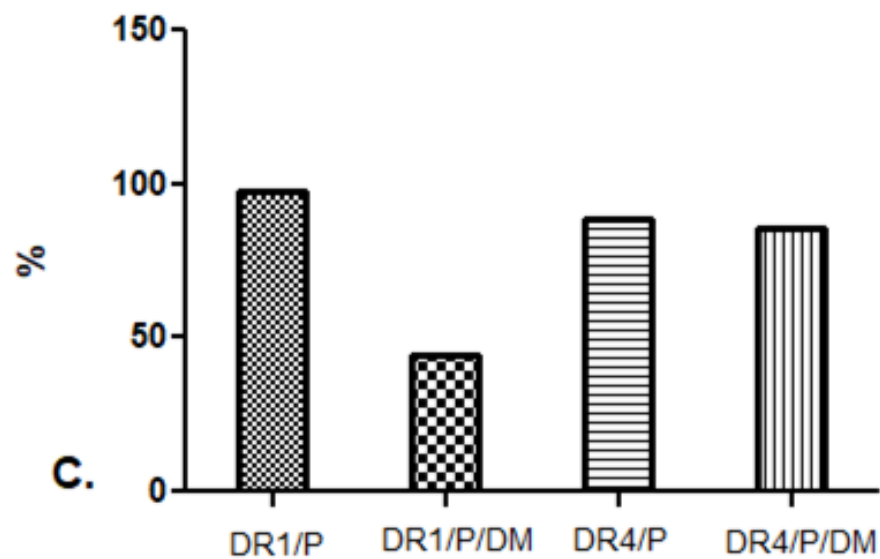


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

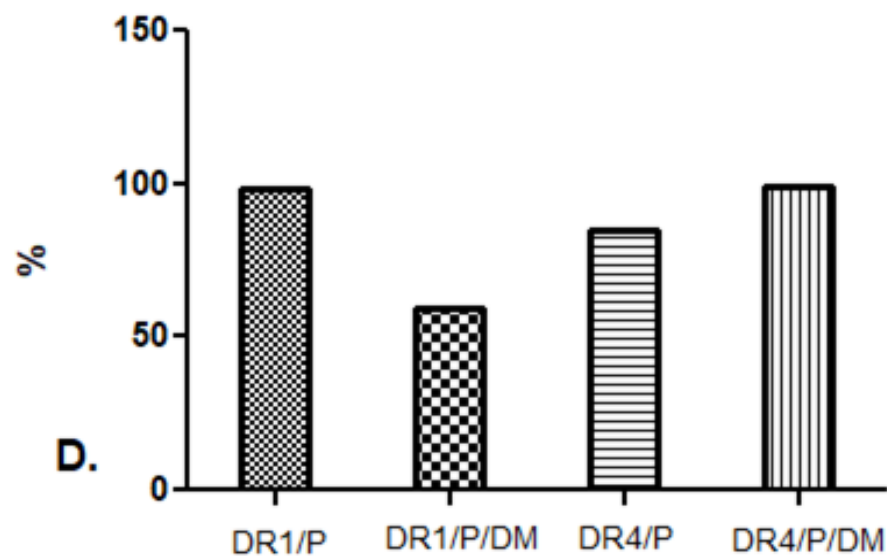


**% de unión relativo de L-962**



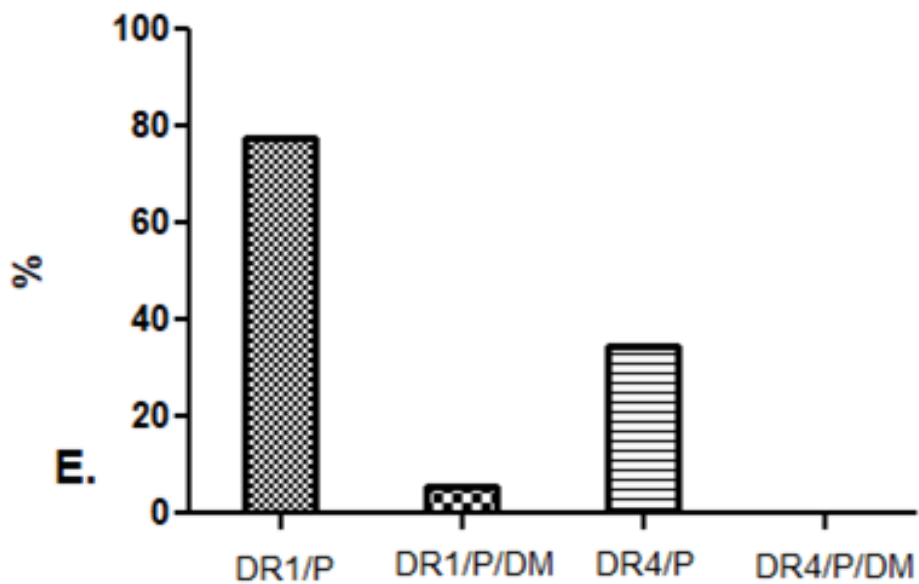
**Tipo de reacción**

**% de unión relativo de N-298**



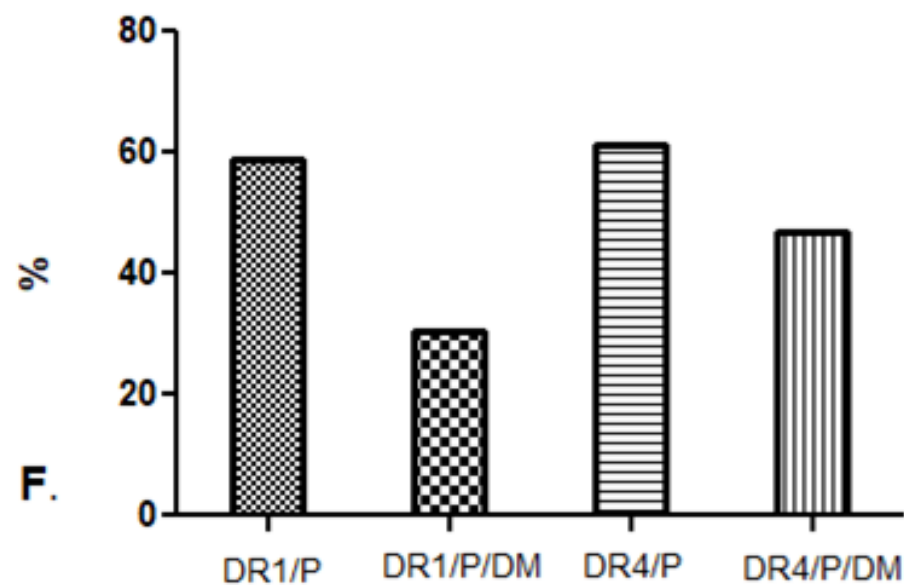
**Tipo de reacción**

**% de unión relativo de L-832**



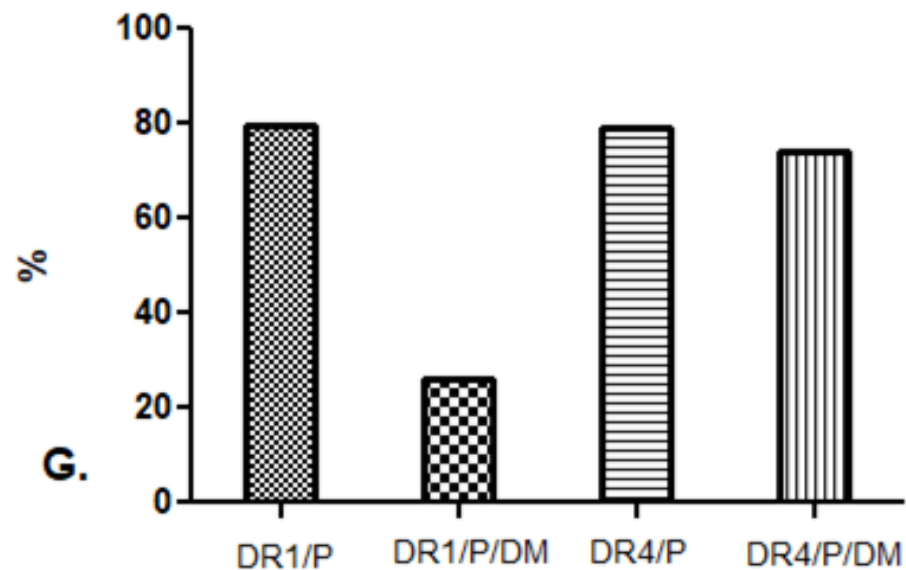
**Tipo de reacción**

**% de unión relativo de L-449**



**Tipo de reacción**

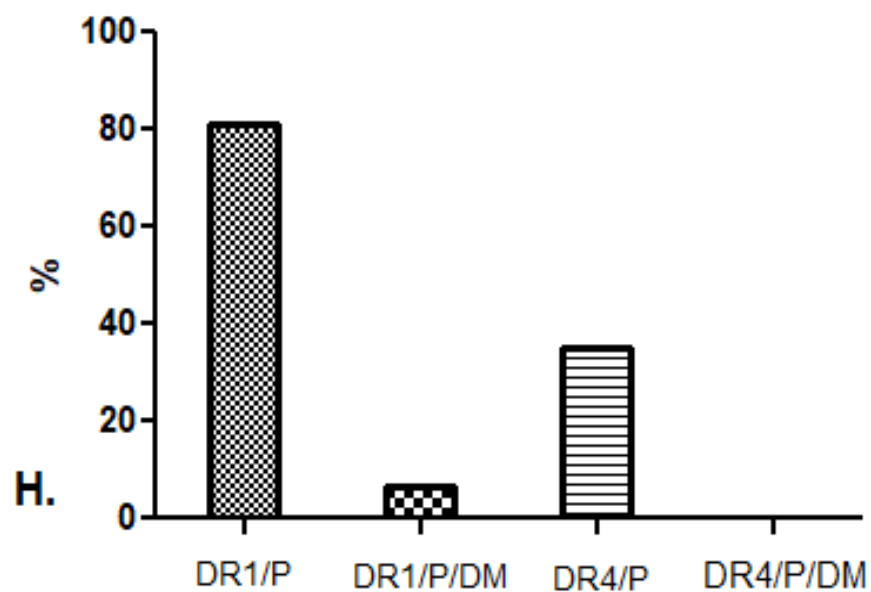
**% de unión relativo de M-68**



**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

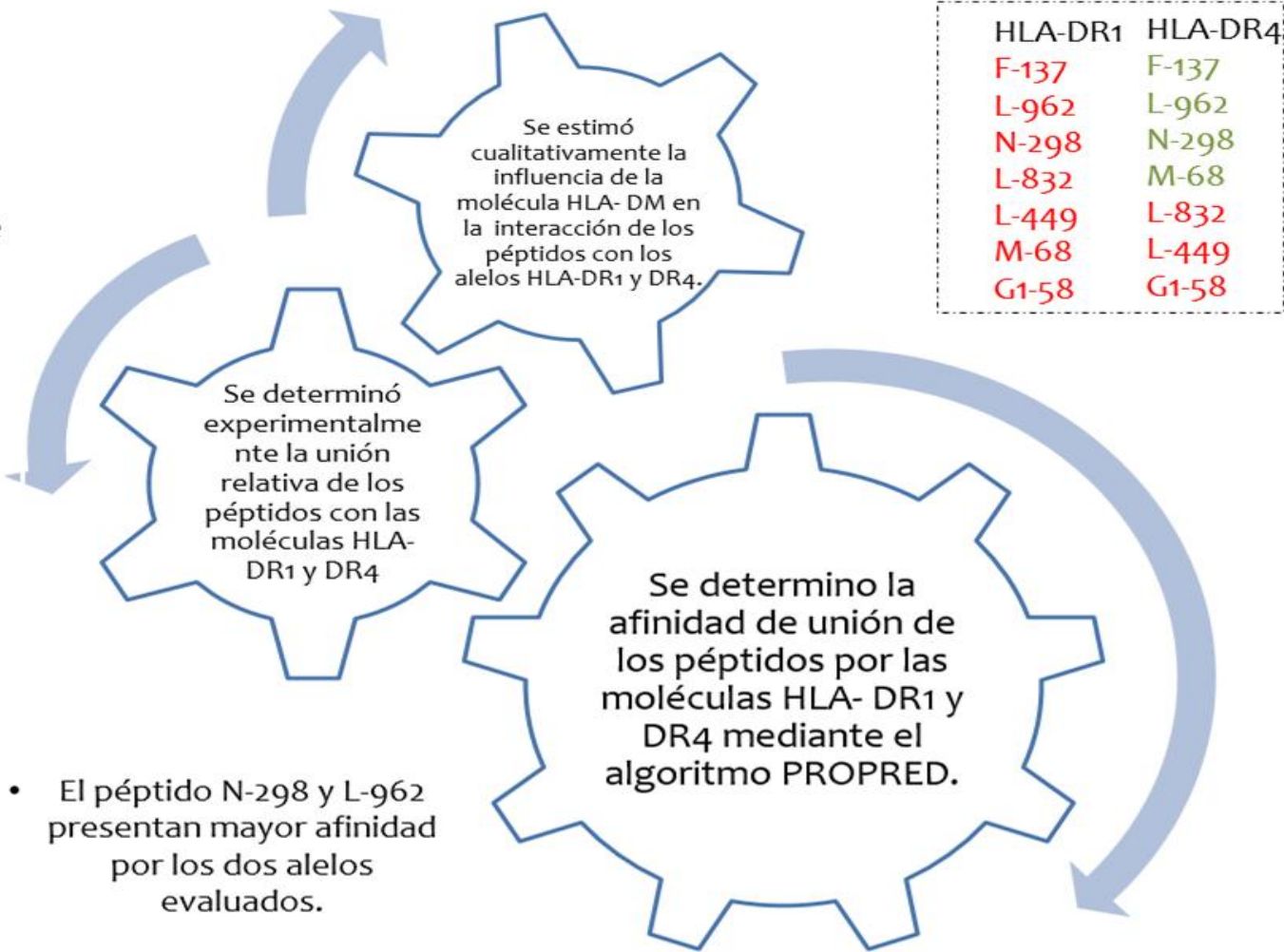
Es necesario tener en cuenta el efecto de la molécula HLA-DM en esta interacción **Achal Pashine et al 2003. Lawrence J Stern. 2011**

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

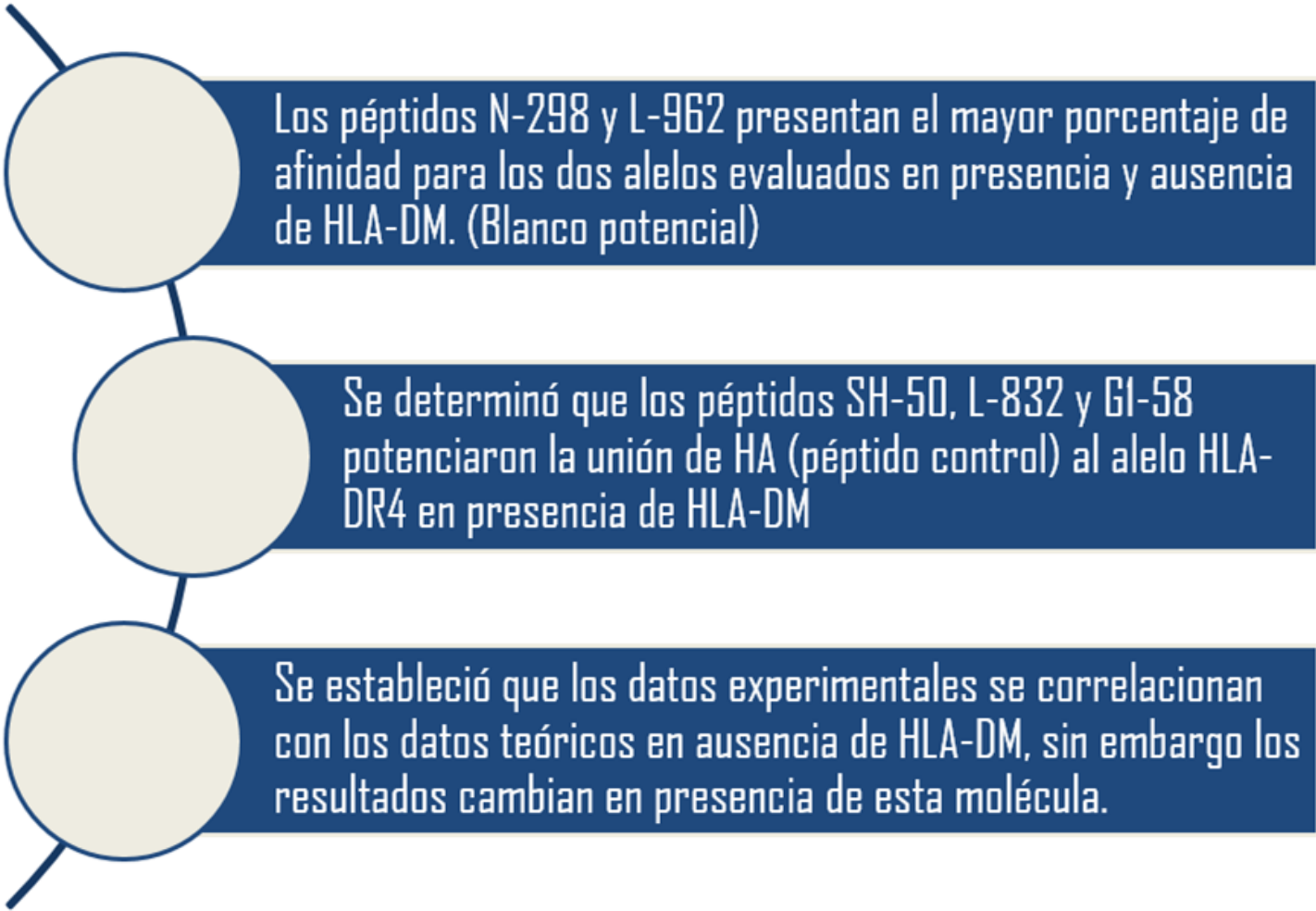
Moléculas pequeñas pueden llegar a modular la formación del complejo HLA-DR/péptido de manera análoga a HLA-DM.

**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%).



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



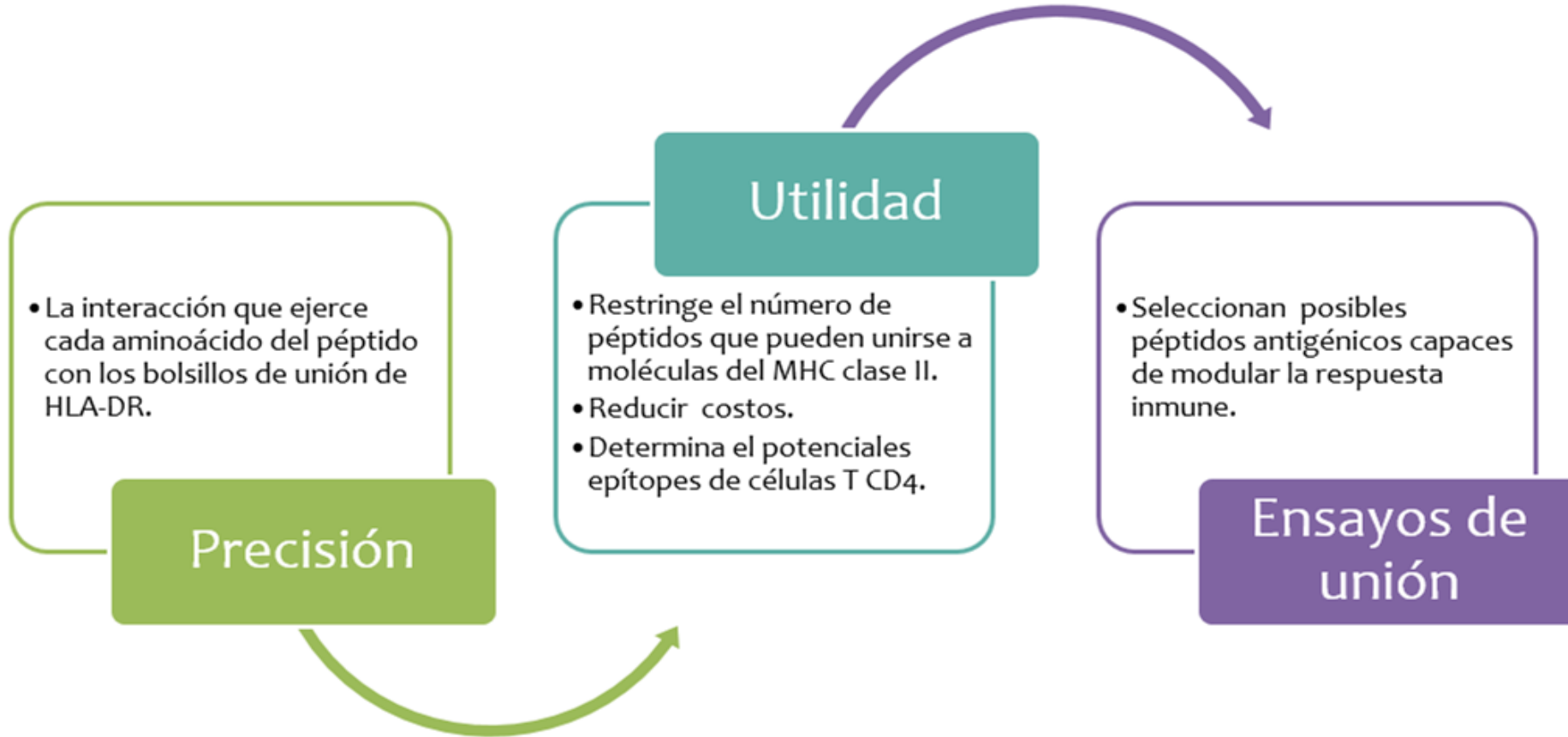
Los péptidos N-298 y L-962 presentan el mayor porcentaje de afinidad para los dos alelos evaluados en presencia y ausencia de HLA-DM. (Blanco potencial)

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.