

DISEÑO DE UN PÉPTIDO QUÍMERICO CONSERVADO PARA EXPRESARSE EN TOMATE COMO VACUNA COMESTIBLE CONTRA EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: UN ENFOQUE BIONFORMÁTICO

L.S. de la Rosa Meléndez, J.E. Escobedo Silva, B. Pereyra Alférez, L.J. Galán Wong y J.A. Gallegos López*

Universidad Autónoma de Nuevo León,
Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología
Ave. Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria,
San Nicolás de los Garza, N.L. México. 66455.
*juan.gallegoslp@uanl.edu.mx

Summary

The Human Papillomavirus (HPV) causes cancer in humans. Currently, there are vaccines against HPV but they do not protect against all serotypes. Using bioinformatics, it is possible to predict vaccine candidate peptides (VCPs) quickly and rationally. Additionally, plants offer advantages for producing recombinant vaccines. The objective of this study was to design in silico a conserved chimeric peptide (CP) to be expressed in tomato against all cancer-causing HPV serotypes in the world. For this, sequences of the L1 protein of the most prevalent oncogenic HPVs in the world were aligned, conserved peptides were identified, VCPs were predicted and joined with a linker. The theoretical model of the CP was predicted. The nucleotide sequence encoding CP was optimized with the preferential codons of tomato (*Solanum lycopersicum*) and cloned in silico into the plasmid pBI121 of *Agrobacterium tumefaciens*. The plasmid pBI121-PQ carrying the optimized sequence with the preferential codons of the tomato encoding the CP carrying two conserved VCPs of L1 proteins of the most prevalent oncogenic HPVs in the world was obtained. In this study, a CP with the potential to stimulate an immune response against the world's HPV

serotypes was designed for the first time. However, more in vitro and in vivo studies will be required to corroborate the effectiveness of the vaccine.

Keywords: In silico, Vaccine, Virus, Chimeric Peptide.

Resumen

El Virus del Papiloma Humano (VPH) causa cáncer en el ser humano. Actualmente, existen vacunas contra el VPH pero no protegen contra todos los serotipos. Mediante bioinformática, es posible predecir péptidos candidatos a vacuna (PCV) de manera rápida y racional. Además, las plantas ofrecen ventajas para producir vacunas recombinantes. El objetivo de este estudio fue diseñar in silico un péptido quimérico (PQ) conservado para expresarse en tomate contra todos los serotipos del VPH que causan cáncer en el mundo. Para esto se alinearon secuencias de la proteína L1 de VPH oncogénicos más prevalentes en el mundo, se identificaron péptidos conservados, se predijeron PCV y se unieron con un enlazador. Se predijo el modelo teórico del PQ. La secuencia nucleotídica codificante del PQ se optimizó con los codones preferenciales del tomate (*Solanum lycopersicum*) y se clonó in silico en el plásmido pBI121

de *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvo el plásmido pBI121-PQ portador de la secuencia optimizada con los codones preferenciales del tomate codificante del PQ portador de dos PCV conservados de proteínas L1 de los VPH oncogénicos más prevalentes en el mundo. En este estudio se diseñó por primera vez un PQ con potencial para estimular una respuesta inmunológica contra los serotipos de VPH del mundo. No obstante, se requerirán más estudios in vitro e in vivo para corroborar la eficacia de la vacuna.

Palabras clave: In silico, Vacuna, Virus, Péptido Quimérico

Introducción

El Virus del Papiloma Humano se transmite por contacto sexual y puede causar cáncer en el ser humano. Actualmente, existen vacunas contra algunos tipos de VPH oncogénicos. Entre las cuales se encuentran Cevaxix (tipos 16 y 18), Gardasil (tipos 6, 11, 16 y 18), y Gardasil9 (tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58). No obstante, estas vacunas no protegen contra todos los serotipos de VPH causantes de cáncer. Por tal motivo es urgente el desarrollo de una vacuna que proteja contra todos los tipos del VPH1.

Los epítomos son de particular interés, ya que tienen un gran potencial para el diseño de vacunas, prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades²

Mediante bioinformática, es posible predecir epítomos contra microorganismos patógenos de una manera más rápida, barata y racional³. Así mismo, para los países en vías de desarrollo, las plantas representan una opción más accesible para la producción vacunas recombinantes. Algunas ventajas son la seguridad, el tiempo, el costo de producción, la similitud de la síntesis de proteínas y patrones de glicosilación que comparten con las células animales, sin mencionar, que las plantas recombinantes solo requieren de agua, minerales y sol para crecer, a diferencia del costoso proceso para producir proteínas recombinantes en células de mamíferos⁴⁻⁵

En este estudio se diseñó, mediante herramientas bio-

informática, un PQ conservado para ser expresado en el tomate contra los tipos de VPH oncogénicos más prevalente en el mundo.

Metodología

Obtención de las secuencias aminoacídicas de la proteína L1 del VPH

Se seleccionó la proteína L1 del VPH en base a la información de la página ViralZone. Posteriormente, las secuencias aminoacídicas de la proteína L1 se obtuvieron de la base de datos del GenBank y PAVE.

Análisis inmunoinformático

Los péptidos conservados se analizaron con herramientas del Immune Epitope Database and Analysis Resources (IEDB) <http://tools.iedb.org/bcell/>, para identificar péptidos que fueran inmunogénicos, antigénicos, hidrofílicos, accesibles, flexibles y que se encontraran en giros β . Los péptidos que reunieron estas características fueron considerados PCV.

Verificación de la accesibilidad de los PCV en el PQ

Los PCV se unieron con el enlazador GGGGS para obtener la secuencia del PC. Se obtuvo la estructura tridimensional del PQ con Phyre2 y se verificó la accesibilidad de los PCV con el programa Swiss-PDB Viewer.

Optimización de la secuencia nucleotídica

El PQ diseñado se tradujo inversamente en secuencia nucleotídica, la cual se optimizó con los codones preferenciales de la planta de tomate. Al extremo 5' de la secuencia optimizada se le agregó el sitio de restricción BamHI, el sitio de unión a ribosoma (Kozak) y el codón de inicio de la traducción. Así mismo, al extremo 3' se le agregó la secuencia que codifica para el péptido señal del retículo endoplásmico (SEKDEL), el codón de paro y el sitio de restricción SacI. Además, la secuencia nucleotídica optimizada se clonó in silico en el plásmido binario pBI121 de 14, 758 pares de bases (pb) de *A. tumefaciens*.

Resultados y discusión

Péptidos conservados

Se calculó un alineamiento múltiple de secuencias de la proteína L1 de los serotipos de VPH oncogénicos más prevalentes en el mundo, a partir del cual se identificaron dos péptidos conservados.

Análisis inmunoinformático

Los dos péptidos conservados resultaron ser inmunogénicos, antigénicos, hidrofílicos, accesibles, flexibles y estar en un giro β (Figura 1), lo que sugiere que son péptidos candidatos a vacuna. Su inmunogenicidad permitirá estimular la producción de anticuerpos⁶ y su accesibilidad permitirá unirse a los anticuerpos, importante en el diseño de vacunas, ya que la unión antígeno-anticuerpo permite desencadenar una respuesta inmunológica⁶. La metodología usada en presente este estudio fue similar a la empleada por Gallegos-López y colaboradores, que en el 2022 diseñaron mediante bioinformática, una proteína de fusión portadora de epítopos conservados para expresarse en tomate contra las variantes de preocupación del SARS CoV-29.

Estructura tridimensional del del PQ y accesibilidad

En la figura 2 se muestra la estructura 3D del PQ obtenido con el programa phyre.2 Los análisis del PC con Pdb Viewer mostraron que los PCV se encuentran accesibles.



Accesibilidad 1.000
Antigenicidad 1.035
Inmunogenicidad 0.350
Hidrofilia 1.111
Flexibilidad 1.005
Giro beta 1.006

Figura 1. PQ portador de los PCVs sugeridos por las herramientas del IEDB y los umbrales utilizados en cada análisis.

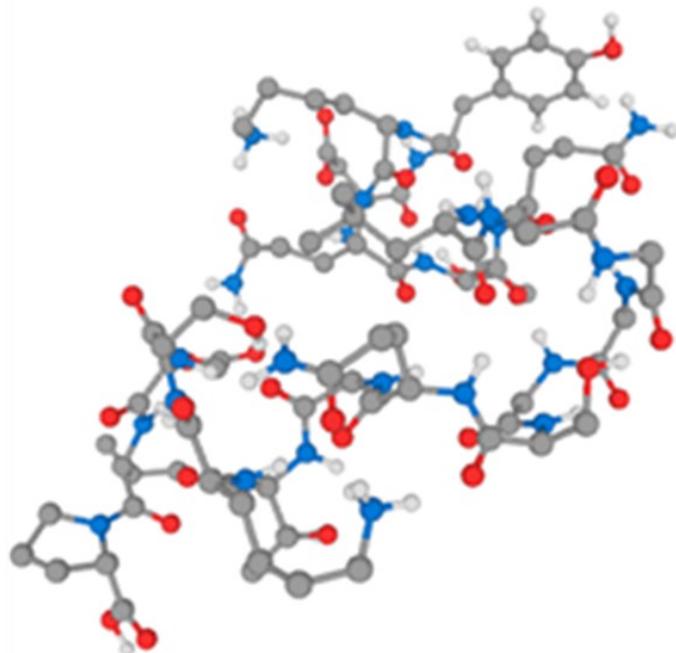


Figura 2. Estructura tridimensional del PQ en formato de balls and sticks.

Optimización de la secuencia nucleotídica

Además, se obtuvo una secuencia nucleotídica optimizada con codones preferenciales del tomate, con una longitud de 60 pares de bases, y un porcentaje de G+C y A+T del 37% y 63%, respectivamente (Figura 3). Esto permitirá obtener altos niveles de expresión del PC, tal como se ha sugerido en otro estudio⁷. La nueva construcción llamada pPBI121-PQ, mostró un tamaño de 14, 818 pb.

Múltiples estudios han confirmado la viabilidad de *S. lycopersicum* como vehículo para la producción de proteínas recombinantes como vacunas orales. Se ha expresado la inmunoglobulina humana tipo A recombinante, dirigida contra el péptido VP8 de la cepa del rotavirus SA11, mostrando una inhibición fuerte a la infección por el virus en ensayos in vitro⁸.

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que el PQ conservado diseñado in silico, para expresarse en tomate como

*Bam*HI kozak start D Y K Q T Q
5'gga tcc gca aca atg gau uau aaa caa acu caa

L G G G G S Q A T K S
cuu gga gga gga gga agu caa gcu acu aaa agu

D V P sekdel stop
gau guu caa aga gaa aag gat gaa ctc taa

Sac I
gag ctc 3'

Figura 3. Secuencia nucleotídica optimizada que codifica para el PQ.

una vacuna comestible, tiene el potencial para estimular una respuesta inmunológica contra los serotipos de VPH oncogénicos más prevalentes en el mundo. No obstante, se requieran de más estudios in vitro e in vivo para verificar la eficacia de la vacuna.

Agradecimientos

A Rafael Alejandro Garza Paz por su colaboración en la realización de este estudio.

Referencias

Sofiani V.H., Veisi P., Rukerd M.R.Z., Ghazi R. & Nakhaie M. 2023. The complexity of human papilloma virus in cancers: a narrative review. *Infectious Agents and Cancer*, 18 (1): 1-14.

Soria-Guerra, R.E., Nieto-Gómez R., Govea-Alonso D. O., & Rosales-Mendoza S. 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *Journal of biomedical informatics*, 53: 405-414.

Sette A. & Rappuoli, R. 2010. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity*, 33(4): 530-541.

El-Turkey, A., El-Attar A.K., Aboulata A.E., Othman B. & El-dougDoug K.A. 2014. Expression of Recombinant gD2 Protein in Transgenic Tomato plants for development of a

plant-derived vaccine against Human herpes virus 2. *Egyptian J. Virol*, 11(2): 1-13.

Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T. & Kononowicz A. K. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3): 881-902.

Hughes E.E. & Gilleland Jr H.E. 1995. Ability of synthetic peptides representing epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* to afford protection against *P. aeruginosa* infection in a murine acute pneumonia model. *Vaccine*, 13(18): 1750-1753.

Félix Gil F., Brun A., Wigdorovitz, A., Catalá R., Martínez-TorreCuadrada, J.L., Casal I. & Escribano J.M. 2001. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS letters*, 488(1-2): 13-17.

Juárez P., Presa S., Espí J., Pineda B., Antón M., Moreno V., Bruesa J., Granell A., Orzaez D. 2012. Neutralizing antibodies against rotavirus produced in transgenically labelled purple tomatoes. *Plant Biotechnology Journal*, (10): 341-350.

Gallegos-López J.A., Garza-García D.M., Martínez-Villalobos J.M., Viader-Salvadó J.M., Guerrero Olazarán M., Galán-Wong L.J. 2022. Diseño de una proteína de fusión para expresarse en tomate contra el SARS-CoV-2: un enfoque bioinformático. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*, 10(55): 100-113.