

Diseño *in silico* de una vacuna comestible para su expresión en tomate contra Parechovirus

J.A. Gallegos-López*, L.J. Galán-Wong, B. Pereyra-Alfárez, , L.A. Galán-Franco, J.A. Rodríguez-Arzave, M.C. Ojeda-Zacarías y M. Elías-Santos

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas,
Instituto de Biotecnología
Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

*Autor para correspondencia: juan.gallegoslp@uanl.edu.mx

Resumen

El Parechovirus (HPeV) es un género de virus de la familia Picornaviridae, infecta principalmente niños menores de dos años, provocando una ligera afección gastrointestinal y respiratoria, pero en casos graves puede provocar miocarditis, encefalitis y septicemia. Actualmente, no existe una vacuna, ni medicamento específico aprobado contra este virus, por tal motivo es importante desarrollar de una vacuna contra el HPeV. La vacunología inversa, permite predecir *in silico* epítopos y desarrollar vacunas rápidamente. Además, las plantas ofrecen ventajas para producir vacunas recombinantes. El propósito de este estudio fue diseñar *in silico* una vacuna oral contra el HPeV, para expresarse en la planta de tomate. Se obtuvieron secuencias aminoácidas de la proteína VP0 de diferentes genotipos del HPeV de la base de datos de Uniprot, se realizó un alineamiento múltiple y se calculó una secuencia consenso. La secuencia se analizó con herramientas inmunoinformáticas, para identificar epítopos. El epítipo identificado se comparó con proteínas de *Homo sapiens*. La secuencia nucleotídica que codifica para el epítipo identificado se optimizó para expresarse en la planta de tomate y se clonó en el plásmido pBI121 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se identificó el epítipo TNLTQHPSAPT en la secuencia consenso de VP0 de HPeV. El análisis con Blastp mostró que la secuencia consenso no posee similitud con proteínas humanas. Se obtuvo la secuencia optimizada, que codifica para el epítipo identificado, para su expresión en la planta de tomate. Se obtuvo la nueva construcción del plásmido llamada pBI121-evp0. En este estudio se diseñó una vacuna oral para expresarse en la planta del tomate. Esta vacuna tiene el potencial para estimular una respuesta inmunológica contra HPeV. No obstante, se requerirán de más estudios *in vitro* e *in vivo* para verificar su efectividad.

Palabras clave: *In silico*, vacuna, virus, epítipo.

Abstract

Parechovirus (HPeV) is a genus of virus in the Picornaviridae family that primarily infects children under two years of age, causing mild gastrointestinal and respiratory illness, but in severe cases, it can lead to myocarditis, encephalitis, and septicemia. Currently, there is no vaccine or specific medication approved against this virus; therefore, developing an HPeV vaccine is crucial. Reverse vaccinology allows for the *in silico* prediction of epitopes and the rapid development of vaccines. Furthermore, plants offer advantages for producing recombinant vaccines. The purpose of this study was to design an *in silico* oral vaccine against HPeV for expression in the tomato plant. Amino acid sequences of the VP0 protein from different HPeV genotypes were obtained from the Uniprot database, multiple sequence alignment was performed, and a consensus sequence was calculated. This sequence was analyzed using immunoinformatics tools to identify epitopes. The identified epitope was then compared with proteins from *Homo sapiens*. The nucleotide sequence encoding the identified epitope was optimized for expression in the tomato plant and cloned into the *Agrobacterium tumefaciens* pBI121 plasmid. The epitope TNLTQHPSAPT was identified in the HPeV VP0 consensus sequence. Analysis with BLASTp showed that the consensus sequence has no similarity to human proteins. The optimized sequence encoding the identified epitope was obtained for expression in the tomato plant. The new plasmid construct, named pBI121-vp0, was obtained. In this study, an oral vaccine was designed for expression in the tomato plant. This vaccine has the potential to stimulate an immune response against HPeV. However, further *in vitro* and *in vivo* studies will be required to verify its effectiveness.

Keywords: *In silico*, vaccine, virus, epitope.

Introducción

El HPeV es un género de virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*. Este género se compone por las especies A, B, C y D. La especie A infecta al ser humano y está conformado por 19 genotipos. Los HPeV 1-2 y 4-8 producen una leve enfermedad gastrointestinal y respiratoria y ocasionalmente miocarditis, encefalitis, neumonía, meningitis parálisis flácida, síndrome de Reye e infección fatal neonatal. En contraste el HPeV-3 es el genotipo más agresivo, ya que provoca infección severa del sistema nervioso central y sepsis. El HPeV infecta principalmente a menores de dos años y su ruta de transmisión es fecal oral. A la fecha no se cuenta con una vacuna, ni tratamiento específico aprobado por la FDA contra ningún genotipo del HPeV¹. Por tal motivo, es necesario desarrollar una vacuna. Las vacunas son de particular interés para la prevención de enfermedades infecciosas. Las vacunas basadas en epítopo son un tipo de vacuna más segura, debido a que solo usan una parte del virus. La vacunología inversa es un enfoque que permite predecir epítopos de microorganismos patógenos mediante bioinformática, lo que permite desarrollar vacunas más rápido y a bajo costo²⁻³. Así mismo, las plantas ofrecen ventajas para la producción de proteínas recombinantes, tales como seguridad, modificaciones postraduccionales y bajo costo de producción. Adicionalmente, múltiples estudios han demostrado la viabilidad de *S. lycopersicum* para la producción de vacunas orales^{4,5,6}. En este estudio se predijo *in silico* un epítopo de la proteína VP0 del HPeV, para expresarse en *S. lycopersicum* como una vacuna comestible contra los genotipos 1-8 del HPeV.

Material y métodos

Obtención de secuencias de la proteína VP0

Para este estudio se seleccionaron las proteínas VP0 de los genotipos 1-8 del HPeV. Estas secuencias ami-

noacídicas se obtuvieron de la base de datos de Uniprot.

Determinación de secuencia consenso de proteínas VP0

Con el programa Bioedit se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas VP0 de los genotipos 1-8 de HPeV y se calculó una secuencia consenso.

Análisis inmunoinformático de la secuencia consenso de proteínas VP0

La secuencia consenso se analizó con herramientas inmunoinformáticas del Immune Epitope Database and Analysis Resources (IEDB) para predecir epítopos.

Modelamiento molecular de la proteína VP0 consenso y verificación de la accesibilidad del epítopo identificado

La estructura tridimensional de la secuencia consenso de la VP0 del HPeV se modeló con el programa Phyre2. El modelo teórico se visualizó con el programa Swiss-PDB Viewer y se verificó la accesibilidad del epítopo.

Comparación del epítopo identificado con proteínas de humanas

La secuencia consenso se comparó con proteínas de *Homo sapiens* empleando el programa BlastP.

Optimización de la secuencia nucleotídica

La secuencia del epítopo identificado se tradujo inversamente en secuencia nucleotídica con los codones preferenciales de la planta de tomate. Además, a su extremo 5' se agregó el sitio de restricción *Bam*HI, el sitio de unión a ribosoma (secuencia Kozak) y el

codón de inicio. Así mismo, al extremo 3' se agregó la secuencia que codifica para el péptido señal del retículo endoplásmico, llamado SEKDEL, el codón de paro y el sitio de restricción *SacI*. 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

Selección y obtención de la secuencia

Para este estudio se seleccionaron secuencias de la proteína VP0 de las cepas 1-8 del HPeV. Esta proteína se seleccionó por estar en la superficie del virus, porque permite la unión del virus a la célula huésped y por ser antigena⁷.

Análisis inmunoinformático

Las herramientas de predicción de epítomos de células B del IEDB predijeron el epítopo TNLTQHPSAPT de

la posición 78 a la 88 de la secuencia consenso de la proteína VP0 del HPeV. Este epítopo resultó ser accesible, hidrofílico, flexible y estar en un giro beta, esto sugiere que el epítopo se encuentra accesible a los anticuerpos, en la superficie de la proteína. Así mismo, el programa Swiss-Pdb Viewer confirmó la accesibilidad del epítopo. Esta característica es importante en el diseño de vacunas, ya que la unión antígeno-anticuerpo permite desencadenar una respuesta inmunológica. Adicionalmente, el epítopo resultó ser inmunogénico (Figura 1), lo que permite estimular la producción de anticuerpos⁸. Así mismo, el epítopo fue antigénico, lo que indica la habilidad del antígeno para unirse al anticuerpo.

Análisis de Blastp

El análisis con la herramienta Blastp, no mostró similitud significativa entre la secuencia consenso y proteínas humanas. Lo anterior indica que es poco pro-

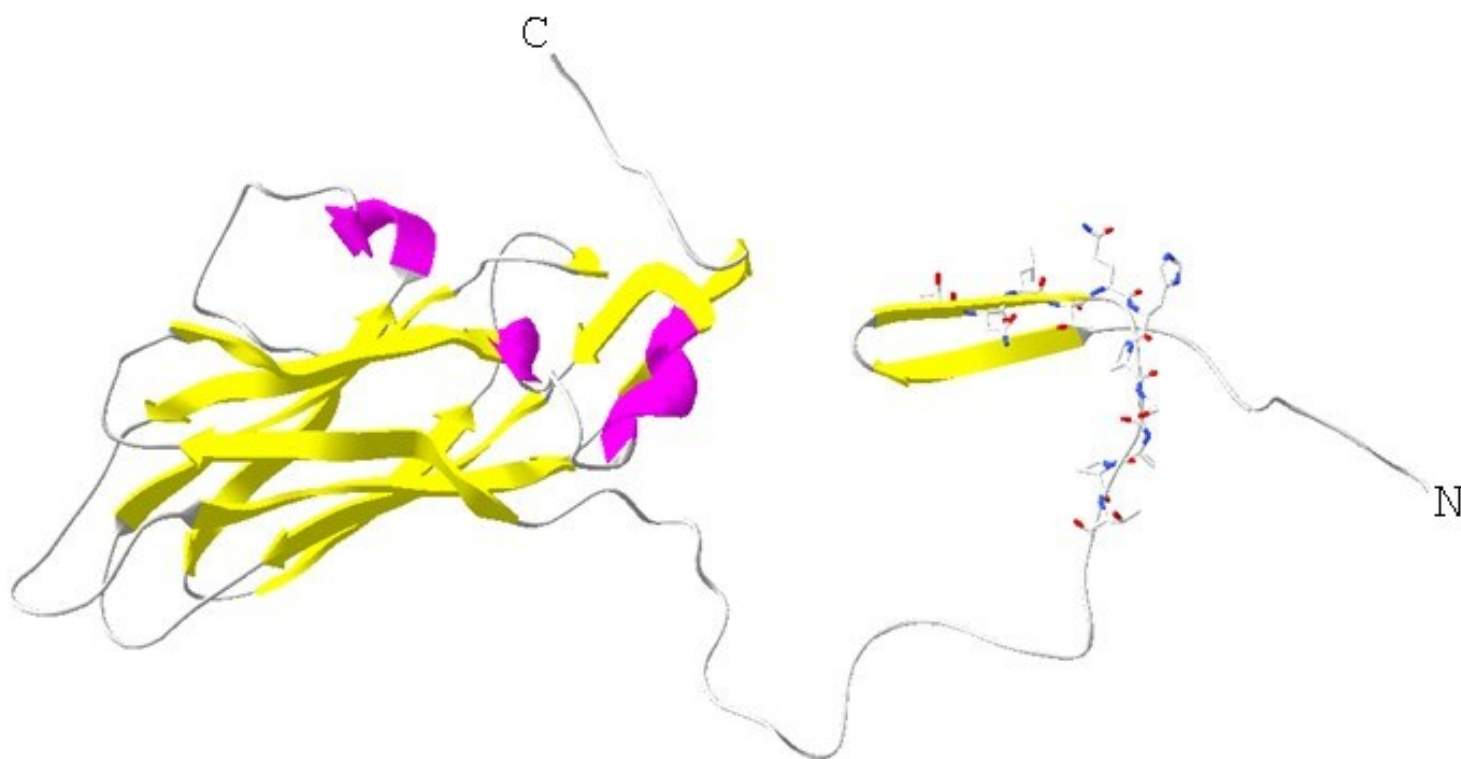


Figura 1. Estructura tridimensional de la proteína VP0 consenso del HpeV en formato de listón. El epítopo se muestra en formato balls and sticks.

bable que el epítipo identificado induzca la producción de anticuerpos contra tejido humano.

Optimización de la secuencia nucleotídica

Se obtuvo una secuencia nucleotídica optimizada con codones preferenciales del tomate, con una longitud de 99 pb, y un porcentaje de G+C y A+T del 39% y 61%, respectivamente (Figura 2). En otro estudio la optimización de la secuencia nucleotídica con los codones preferenciales del tomate permitió obtener altos niveles de expresión de la proteína recombinante⁹. El nuevo plásmido, pPBI121-vp0, portador de la secuencia consenso optimizada, mostró un tamaño de 14, 857 pb.

Conclusiones

En este estudio se predijo *in silico* un epítipo conservado en la proteína vp0 del HPeV, para expresarse en la planta de tomate, como una vacuna comestible. Los resultados mostraron que la vacuna posee el potencial para estimular una respuesta inmunológica contra los genotipos 1 al 8 del HPeV. No obstante, se requerirán de más estudios *in vitro* e *in vivo* para verificar la eficacia de la vacuna.

Agradecimientos

A la QBP Deborah Cristina Hernández González por su colaboración.

Referencias

1. Stanway G., Joki-Korpela P., Hyypiä T. (2000). Human parechoviruses-biology and clinical significance. *Reviews in medical virology* 10(1): 57-69.
2. Soria-Guerra R.E., Nieto-Gomez 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.

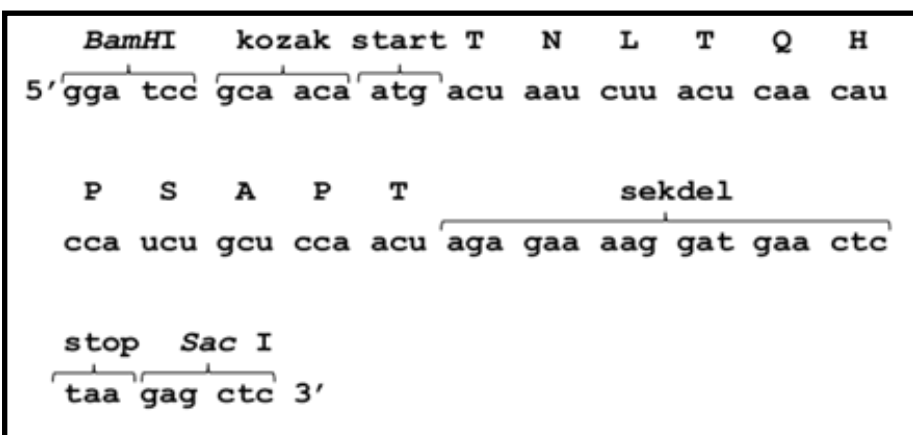


Figura 2. Secuencia nucleotídica optimizada con codones preferenciales del tomate.

3. Sette A., Rappuoli R. (2010). Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* 33(4): 530-541.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Joki-Korpela P., Roivainen M., Lankinen H., Pöyry T., Hyypiä T. (2000). Antigenic properties of human parechovirus 1. *Journal of General Virology* 81(7): 1709-1718.
8. 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.
9. 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.