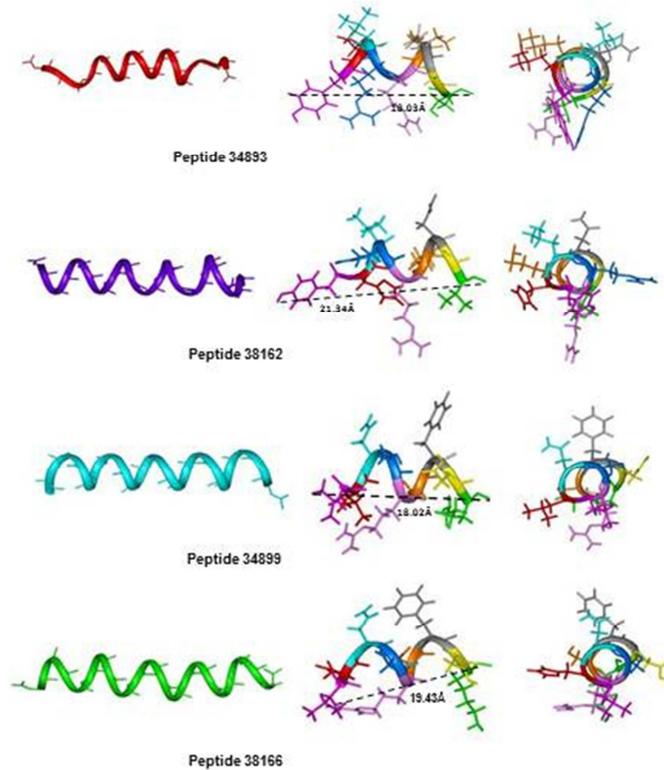


Estudio de las Modificaciones Conformacionales y su Influencia en la Actividad Inmunológica de Péptidos Derivados de las Familias de las Proteínas SPECT-1 y -2, SIAP-1 y -2 de *Plasmodium falciparum*



Martha Patricia Alba Sandoval

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

2015

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Tesis como requisito parcial para optar al título de DOCTOR en Ciencias
Biomédicas

Estudio de las Modificaciones Conformacionales y su Influencia en la
Actividad Inmunológica de Péptidos Derivados de las Familias de las
Proteínas SPECT-1 y -2, SIAP-1 y -2 de *Plasmodium falciparum*

Martha Patricia Alba Sandoval

Director

Profesor Manuel Elkin Patarroyo Murillo

Director de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Bogotá, 2015

7. Determinación de la estructura tridimensional e inmunogenicidad de péptidos (cHABPs y mHABPs), derivados de las proteínas SIAP y búsqueda de la relación entre la estructura 3D y su actividad inmunológica

7. Determinación de la estructura tridimensional e inmunogenicidad de péptidos (cHABPs y mHABPs), derivados de las proteínas SIAP y búsqueda de la relación entre la estructura 3D y su actividad inmunológica

7.1. Introducción

Conforme a la información dada por la OMS respecto a la disminución en un 45% de la tasa de mortalidad por malaria a nivel global, atribuible a las medidas de prevención y control a nivel mundial debido a un mayor compromiso político y a la ampliación de fondos en el sector salud de los diferentes países (1). Sin embargo, la realidad es otra, cada día aumenta la población que está en riesgo de adquirir malaria por varias razones, entre las que se encuentran: desplazamiento de la población debido a la violencia, al calentamiento global y a la resistencia del parásito a los tratamientos existentes para tratar la enfermedad (1). Por lo anterior, y pese a los grandes avances que se han hecho en el control de la malaria, se hace necesario seguir en la búsqueda de alternativas para controlar la enfermedad y reducir en gran medida la mortalidad por malaria.

Una de estas alternativas es el desarrollo de una vacuna eficaz, lo cual ha sido complicado debido a la alta complejidad del parásito y el pobre conocimiento que se tiene acerca de los blancos antigénicos de la inmunidad protectora (4).

En el contexto del diseño de nuevas vacunas contra la malaria la FIDIC ha venido desarrollando un proyecto de investigación que involucra la caracterización de antígenos del estadio exo-eritrocítico y sanguíneo del parásito, que incluye específicamente secuencias cortas involucradas en los procesos de unión e invasión a las células hospederas, con el fin de convertirlas en altamente inmunogénicas y usarlas en el desarrollo de una nueva vacuna eficaz (3, 8). En este camino, el presente estudio realizó la caracterización estructural de los péptidos de alta capacidad de unión de las proteínas SIAPs y de alguno(s) de sus péptidos modificados, que indujeron anticuerpos contra el *Plasmodium* en monos *Aotus*, determinando la existencia de una relación entre la estructura tridimensional que estos péptidos adoptaron con su actividad inmunológica.

7.2. Proteínas Asociadas con la Invasión del Esporozoíto -1 y 2 (Sporozoite Invasion-Associated Proteins -1 and -2 -SIAP-1 y -2)

SIAP-1 es una proteína que tiene un peso molecular de 113 kDa con dominios transmembranales y SIAP-2 con 45 kDa (Figure 39) codificadas por un solo exón, son expresadas predominantemente en la fase hepática del parásito y ambas por predicción contienen un péptido señal, lo que sugiere que pueden ser exportadas hacia la superficie del esporozoíto. La localización de estas dos proteínas fue deducida por ensayos de inmunofluorescencia realizados en esporozoítos de las glándulas salivares del mosquito, localizándose en la zona periférica del esporozoíto, similar a la disposición que presenta CSP, lo que sugiere la presencia de estas proteínas en la superficie del esporozoíto (122). Adicionalmente, el análisis por Western blot deja ver que SIAP-1 podría ser clivada proteolíticamente después de su exposición al hepatocito similar, a como sucede con AMA-1, CSP y TRAP (47, 122).

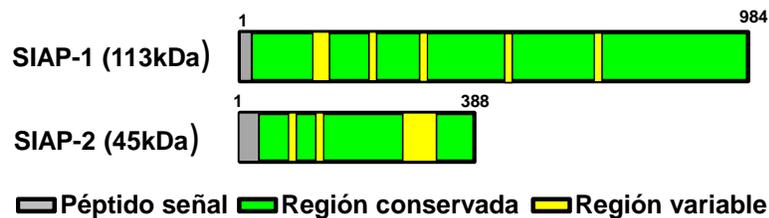


Figura 39. Representación esquemática de SIAP-1 y -2. En paréntesis se muestra el peso molecular y el largo de la barra es aproximadamente el número de aminoácidos de su secuencia.

Proteínas ortólogas a SIAP-1 fueron encontradas en especies de *Plasmodium* que afectan a los roedores como *P. berghei*, *P. chabaudi* y *P. yoelii*, mientras que ortólogos para SIAP-2 fueron solo encontrados en los *Plasmodium* que afectan primates (*P. vivax* y *P. knowlesi*), lo que sugiere que SIAP-2 puede interactuar con componentes específicos de hepatocitos de primates (122).

Por otro lado Engelmann y colaboradores (123) realizaron la interrupción selectiva del gen *siap-1*, revelando que no se afecta la formación del esporozoíto pero si su salida del oocito, al observarse la acumulación de esporozoítos en el oocito (en el intestino medio), al igual que el bajo número de parásitos en la hemolinfa y en las glándulas salivares de la hembra del *Anopheles*, lo que sugiere que SIAP-1 está involucrada en el “gliding” dentro

del mosquito lo cual está relacionado con la habilidad del parásito para invadir las glándulas salivales y la posterior infección del hospedero mamífero (123). Esto es confirmado cuando realizaron un ensayo, en el cual, ratas expuestas a la picadura de mosquitos infectados con esporozoítos que tenían SIAP-1 (“wild-type”) y esporozoítos sin SIAP-1, estas ratas fueron monitoreadas diariamente por extendidos de sangre para detectar la aparición de la infección en la etapa sanguínea, observando que todos los animales expuestos a esporozoítos “wild type” indujeron parasitemia, mientras que ninguna de las ratas expuestas a esporozoítos sin SIAP-1 mostraron infección en la etapa sanguínea, fortaleciendo la idea que SIAP-1 juega un papel importante en la transmisión del esporozoíto al hospedero mamífero (123).

En cuanto a su función, se realizaron ensayos de inhibición de la invasión utilizando anticuerpos contra SIAP-1 y SIAP-2, como resultado de este estudio se obtuvo, que estos anticuerpos fueron capaces de bloquear la habilidad del parásito para atravesar las células hospederas (migración de los esporozoítos) y de bloquear la invasión del parásito a las células hepáticas (122), sin embargo, ninguna de estas dos proteínas fueron detectadas en el estadio hepático, lo que indicaría que ellas se pierden o son eliminadas poco después del proceso de invasión (122).

Siau y colaboradores en 2008 demostraron por medio de ensayos que SIAP-1 y SIAP-2 están participando en el “cell-traversal” de células HeLa y en la invasión a los hepatocitos (122), lo que hace a estas proteínas blancos interesantes para continuar estudiándolas con el fin de conocer su mecanismo de acción.

En otro estudio Arévalo-Pinzón y colaboradores (124) identificaron ocho péptidos conservados con alta capacidad de unión (HABPs) a células HeLa y HepG2 (34874, 34882, 34885, 34893, 34893, 34898, 34899, 34901, 34916) para la proteína SIAP-1 y un solo péptido (36879) que se une a las dos líneas celulares para la proteína SIAP-2. Adicionalmente, mostraron que estos cHABPs tienen de 900,000 a 3,500,000 de sitios de unión por célula y que todos presentan una cooperatividad positiva ya que mostraron coeficientes de Hill mayores que 1 (124).

Estos cHABPs, derivados de las proteínas SIAP-1 y -2, mostraron tener alta afinidad por receptores que contienen sulfato de coindritina en las células HeLa y una combinación de este receptor con sulfato de heparina en las células HepG2 (124). Los mismos autores

realizaron el análisis de estos cHABPs por DC, observando que algunos muestran regiones α -helicales y otros son “random”.

Adicionalmente, Arévalo-Pinzón (124) afirma que los HABPs encontrados pertenecientes a estas proteínas corresponden a regiones específicas las cuales reconocen y se unen a los receptores sobre la superficie de la célula, sugiriendo que estas moléculas son un blanco atractivo para bloquear interacciones parásito-hospedero.

Por lo anterior, péptidos nativos de estas proteínas y alguno(s) de sus modificados fueron el objeto de caracterización estructural e inmunológica en este trabajo, por ser altamente susceptibles de ser incluidos en una vacuna antimalárica.

7.3. Resultados y Discusión

De los péptidos previamente identificados como cHABPs por Arévalo-Pinzón y colaboradores en 2011 (124), se escogieron el 34874, 34893, 34898 y 34899 derivados de SIAP-1 y el 36879 proveniente de SIAP-2.

7.3.1. Síntesis, purificación y caracterización de los péptidos

Proteínas SIAP-1 y SIAP-2

Los péptidos 34874, 34893, 34898 y 34899 de SIAP-1 y 36879 derivado de SIAP-2 (Tabla 15), fueron sintetizados por la metodología de síntesis en fase sólida usando la estrategia t-Boc (64), obteniendo que el proceso de síntesis fue exitoso ya que los cromatogramas adquiridos por CLAE-FR analítica mostraron un pico mayoritario, los cuales por MALDI-TOF corresponden al peso molecular esperado de los péptidos. Sin embargo, estos péptidos se purificaron para realizar el análisis por $^1\text{H-RMN}$, en la figura 40 a manera de ejemplo se observa el cromatograma y el espectro de masas del péptido 34893, los cuales muestran que el péptido está puro por la presencia de un solo pico que corresponde al péptido sintetizado y purificado, ya que el peso molecular teórico (2358.00) es igual al obtenido experimentalmente (2357.25).

Tabla 15. Secuencias de los péptidos conservados de alta unión de SIAP-1 y -2 sintetizados, caracterizados y purificados.

Familia	Péptido	Secuencia
SIAP-1	34874	NDRDINTHSVLPEVENVIERY
	34893	KVQGLSYLLRRKNGTKHPVY
	34898	VSAYAHDKNPAEDFAESMAT
	34899	YVLNSKLLNSRSFDKFKWIQ
SIAP-2	36879	LLYSTNSEDNLDISFGELQ

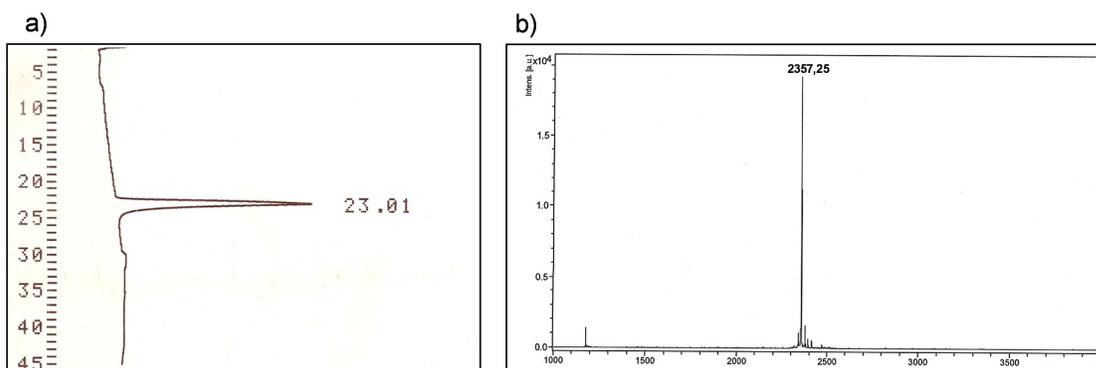


Figure 40. Caracterización del péptido purificado 34893. a) Cromatograma obtenido por CLAE-FR. b) Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF

7.3.2. Diseño de péptidos modificados

Como se mencionó en el capítulo anterior, se tiene conocimiento que los péptidos conservados de alta unión a la célula hospedera no son inmunogenicos, ya que no inducen anticuerpos y tampoco inducen protección contra la enfermedad cuando son inoculados en el modelo animal (10), para cambiar su comportamiento inmunológico se deben hacer reemplazos de alguno(s) de los aminoácidos críticos, siguiendo las reglas reportadas por nuestro grupo en diferentes artículos (3, 8-10), las cuales están descritas en el capítulo anterior. Entonces, solo se diseñaron péptidos modificados a partir de 34893 y 34899 de SIAP-1 y del 36879 de SIAP-2 cuyas secuencias se encuentran en la tabla 16; estos péptidos fueron sintetizados, purificados, caracterizados e inmunizados en el modelo animal mono *Aotus*.

En cuanto a la síntesis, purificación y caracterización de los péptidos modificados se logró obtener el péptido deseado en cada caso, ya que en sus cromatogramas solo se observó

la presencia de una especie la cual por espectrometría de masas corresponde al peso molecular esperado.

Tabla 16. Secuencias de los cHABPs y sus correspondientes mHABPs provenientes de las proteínas SIAP-1 y SIAP-2

Proteína	Péptido	Secuencia
SIAP-1	34893	KVQGLSYLLRRKNGTKHPVY
	38160	KTQGHSYHLRRKNGTKHPVY
	38162	KTQGHSYHLRRKNGVKHPVY
	38894	KTQGHSLHLRRKNGVKHPVY
	38896	KTQGHSLHLRRKNGDKHPVY
	38898	KTQGHSLHLRRKNGSKHPVY
	34899	YVLSKLLNSRSFDKFKWIQ
	38164	YVLSKLLNDRSFDKFKWIQ
	38166	YVLSKLLHNSRSFDKFKWIQ
	38168	YVLSKLLHNSRSFDKFKWIQ
SIAP-2	36879	LLLYSTNSEDNLDISFGELQ
	38154	YSTNSEDNLDIAFGELQLYE
	38156	LHYSTISQDNLDISFGELQ
	38882	LHYSTISVDNLDISFGELQ
	38884	GLHYSTDSQPNLDISFGEL
	38886	GLHYSTDSVNPNDISFGEL

7.3.3. Determinación de la Estructura Tridimensional

Como se mencionó en el capítulo anterior y en la sección de metodología la determinación de la estructura 3D de los cHABPs y los mHABPs derivados de estas proteínas se realizó por dicroísmo circular, por ¹H-NMR y cálculo de estructura.

En este capítulo también se usa el DC como un análisis previo para determinar si el péptido presenta algún tipo de estructura secundaria o son estructuras desordenadas, luego se procede a determinar esta estructura y la región de aminoácidos involucrados en dicha estructura por medio de ¹H-NMR; vale la pena aclarar que se presentan casos que así el péptido tenga estructura secundaria predominante, no se pudo realizar el estudio por ¹H-NMR debido a que algunos péptidos son insolubles en el solvente y en la concentración requerida para realizar dicho análisis.

7.3.3.1. Proteínas SIAP-1 y -2

7.3.3.1.1. Determinación de la estructura de los cHABPs 34874, 34893, 34898, 34899 derivados de SIAP-1 y 36879 de SIAP-2.

7.3.3.1.1.1. Dicroísmo Circular

La característica estructural para estos 5 péptidos fue evidenciada por la presencia de un máximo de absorción en 190 nm y dos mínimos en 222 y 208 nm (Figura 41), los cuales indican la presencia de regiones α -hélice, lo que se confirma con los datos obtenidos de la deconvolución utilizando los programas SELCON3, CDSSTR y CONTINLL (106). Por otro lado, debido a la intensidad de las señales se puede decir con un 97% de exactitud que la estructura preferencial de estos péptidos es una α -hélice (125).

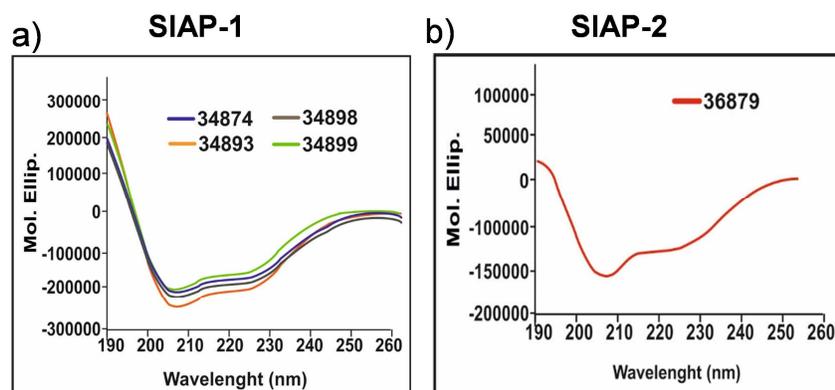


Figura 41. Espectros de DC con sus respectivos mínimos y máximos de absorción de los péptidos 34874, 34893, 34898 y 34899 de SIAP-1 y 36879 de SIAP-2.

Ahora bien, conociendo que estos péptidos muestran alto contenido de estructura secundaria, se siguió con el análisis o determinación de su estructura por medio de ^1H -RMN y de cálculo de estructura.

7.3.3.1.1.2. ^1H -Resonancia Magnética Nuclear

7.3.3.1.1.2.1. Asignamiento

Para los cHABPs 34874, 34893, 34898 y 34899 derivados de SIAP-1 mediante los espectros COSY, TOCSY y la metodología propuesta por Wüthrich (75), se llevó a cabo la

identificación de los sistemas de spin de cada aminoácido que constituyen los péptidos y por ende, para cada hidrógeno se obtuvo su desplazamiento químico, los cuales fueron consignados en tablas. Como ejemplo se muestra la tabla de desplazamiento químico del péptido 34893 (Tabla 17).

Tabla 17. Tabla de desplazamiento químico del cHABP 34893 derivado de SIAP-1.

Péptido 34893					
AA	HN	H α	H β	Otros (H γ , H δ , H ϵ)	
K			1,66; 1,66	γ (CH2)=1,50; 1,50	δ (CH2)=1,74; 1,74 δ (CH2)=2,96; 2,96
V	8,370	3,54	1,90		γ (CH3)= 0,79; 0,79
Q	8,368	4,19	2,17 1,79		γ (CH2)=2,17; 2,17
G	8,220	3,86	-		
L	7,875	4,04	1,51; 1,51		δ (CH3)= 0,77; 0,77
S	7,441	4,03	3,87; 3,75		
Y	7,441	4,03	2,94; 2,94		2,6H= 7,05 3,5H=6,80
L	7,589	3,92	1,58; 1,58	γ H=1,71	δ (CH3)= 0,75; 0,75
L	7,441	4,03	1,52; 1,52		δ (CH3)=0,78; 0,78
R	8,057	3,88	1,52; 1,52		δ (CH2)=2,96; 2,96
R	7,768	3,94	1,69; 1,60	γ (CH2)=1,40; 1,40	δ (CH2)=2,91; 2,91
K	8,081	3,97	1,70; 1,70	γ (CH2)=1,56; 1,56	δ (CH2)=1,74; 1,74 δ (CH2)=2,91; 2,91
N	8,020	4,52	2,67; 2,67		γ NH2=7,45; 6,99
G	7,965	3,78	-		
T	7,719	4,15	3,91		γ (CH3)=1,04
K	7,951	3,94	1,60; 1,60	γ (CH2)=1,51; 1,51	δ (CH2)=1,70; 1,70 δ (CH2)=3,00; 3,00
H	8,010	4,17	3,0; 3,00		2H=8,1 4H=7,15
P	-	4,25	2,06; 1,83	γ (CH2)=1,80; 1,68	δ (CH2)=3,57; 3,49
V	7,934	3,91	1,86		γ (CH3)= 0,76
Y	7,682	4,44	2,78; 2,78		2,6H= 7,16 3,5H=6,88

Por otro lado, el estudio de la variación en el desplazamiento químico de los protones NH amídicos con la temperatura (285, 295 y 305 K) dio como resultado bajos coeficientes de temperatura para 34874, 34893 y 34899, lo que se interpretó como un indicio de que dichos protones están involucrados en un puente o enlace de hidrógeno intramolecular (Figura 42), estabilizando la estructura secundaria presente en dichos péptidos. El péptido 34898 no tiene coeficientes bajos de temperatura, sugiriendo que posiblemente no tiene ningún aminoácido involucrado en enlace de hidrógeno.

7.3.3.1.1.2.2. Asignación de NOEs secuenciales y de media distancia

Después de analizar el espectro NOESY de cada péptido (34874, 34893, 34898 y 34899) en los cuales la presencia de conectividades NOE secuenciales (H α i -HN $i+1$) y correlaciones a través del espacio NOEs de medio rango como (H α i -HN $i+2$), (H α i -

HN*i*+3), (Ha*i*-HN*i*+4) y (Ha*i*-Hβ*i*+3), sugirieron la presencia de regiones α-helicales. Entonces, para el péptido 34874 se encontró una α-hélice entre los residuos V10 y R20; para 34893 y 34898 se encontraron dos regiones de α-hélice de L5 a L8, R10 a G14 y entre S2-K8 y E12-A19, respectivamente; y el 34899 tiene una α-hélice entre los residuos V2-Q20 (Figura 42).

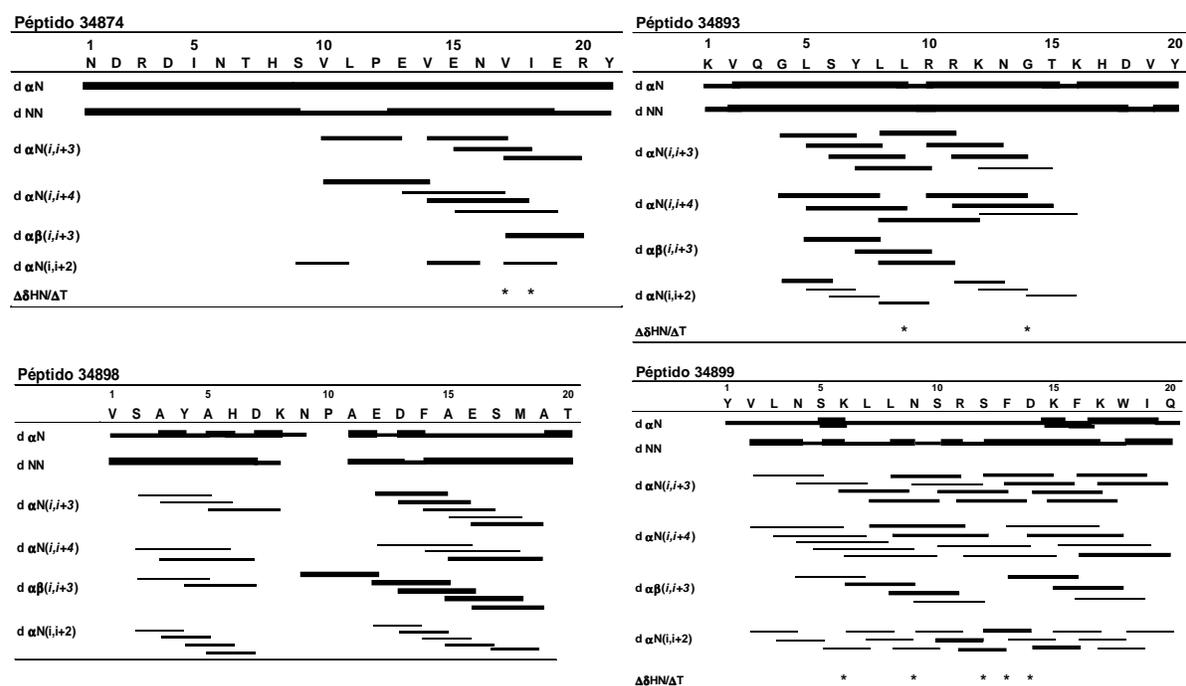


Figura 42. Diagrama de conectividades para 34874, 34893, 34898 y 34899 derivados SIAP-1. El grosor de las líneas indica la intensidad del NOE. * indica los aminoácidos involucrados en enlace de hidrógeno.

El péptido 36879 de SIAP-2 fue insoluble a las condiciones requeridas de concentración para el estudio de ¹H-RMN y por lo tanto no se pudo determinar su estructura.

7.3.3.1.1.3. Cálculo de estructura

Después de realizar el cálculo de estructura para cada péptido gracias a los resultados obtenidos de violación de ángulo y distancia, a los valores bajos de energía y de RMSD en el momento de la superposición del backbone de las estructuras seleccionadas sobre la estructura consenso (Tabla 18), estos resultados sugieren que la α-hélice es la estructura secundaria preferencial de 34874, 34893, 34898 y 34899 (Figura 43), lo que

corroborar los resultados obtenidos por $^1\text{H-RMN}$. Los ángulos diedrales de los residuos involucrados en los fragmentos helicoidales se encontraron en las regiones permitidas en el mapa de Ramachandran (107).

Tabla 18. Resultados del cálculo de estructura para 34874, 34893, 34898 y 34899

Péptido	Características estructurales	NOEs iniciales	Familia confor.	Superposición	RMSD	Máx. Viol. de NOE (Å)	Máx. Viol. de ángulo
34874	α -hélice V10-R20	186	21	V10-Y21	0,17	0,35	2,0
34893	α -helix L5-L8; R10-G14	198	21	L5-G14	0,20	0,30	2,2
34898	α -helix S2-K8; E12-A19	177	21	Y4-A19	0,52	0,28	2,0
34899	α -hélice V2-Q20	228	15	V2-Q20	0,35	0,35	2,5

Familia confor: Número de estructuras seleccionadas en la familia

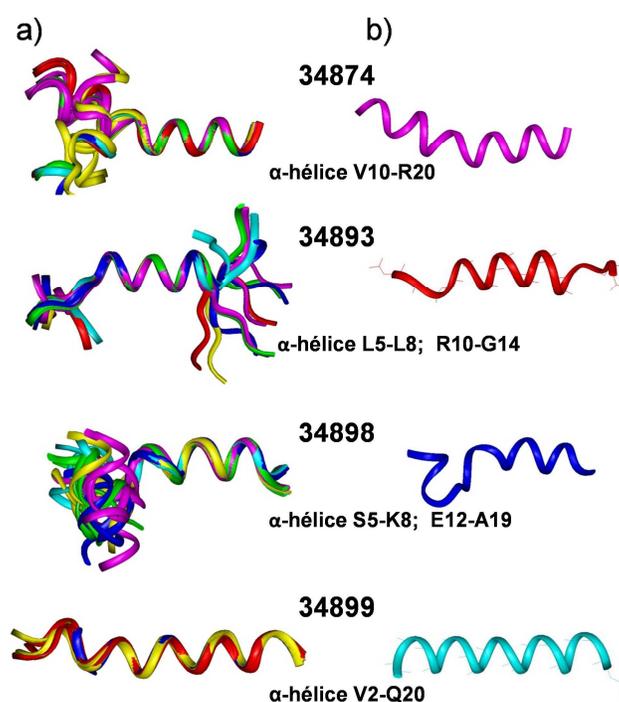


Figura 43. a) Familia de estructuras seleccionadas para 34874, 34893, 34898 y 34899 en donde se observa su región α -helical, b) estructura consenso (la de más baja energía y que cumplió con los datos obtenidos por $^1\text{H-RMN}$) de cada uno de los péptidos.

De los péptidos diseñados (Tabla 16) solo se realizó la determinación de la estructura 3D por DC y $^1\text{H-RMN}$ de los péptidos modificados **38162** derivado del 34893 y del **38166** del 34899 pertenecientes a SIAP-1, ya que los otros péptidos modificados fueron insolubles en el solvente y en la concentración requerida para los análisis por estas dos técnicas.

Por otro lado, se realizó el análisis de la estructura secundaria por DC a los mHABPs **38154**, **38156**, **38884**, **38886** derivados del cHABP 36879 de SIAP-2, mientras que para **38882** del mismo cHABP no fue posible por su insolubilidad.

La determinación de la estructura por $^1\text{H-RMN}$ no se pudo realizar para ninguno de los péptidos modificados derivados del cHABP 36879 de SIAP-2 por problemas de solubilidad en el solvente utilizado en el análisis.

7.3.3.1.2. Determinación de la estructura de los péptidos modificados **38162** derivado de **34893** y **38166** del cHABP **34899** pertenecientes a SIAP-1 y **38156**, **38884**, **38886** y **38888** provenientes del **36879** de SIAP-2

7.3.3.1.2.1. Dicroísmo Circular

El estudio por DC de los péptidos **38162** y **38166** (SIAP-1) (Figura 44a), **38154**, **38156** y **38886** (SIAP-2) dio como resultado que su estructura predominante es del tipo α -hélice, ya que como se muestra en la figura 44b se observan las bandas características para este elemento estructural, un máximo en 190 nm y dos mínimos en 208 y 228 nm. Este comportamiento α -helical para estos péptidos también se observó en la deconvolución de los datos obtenidos por los métodos SELCON3, CONTILL y CDSSRT. Por otro lado, el **38884** muestra un comportamiento desordenado en su estructura por la fuerte banda de absorción que muestra en 202 nm (Figura 44b).

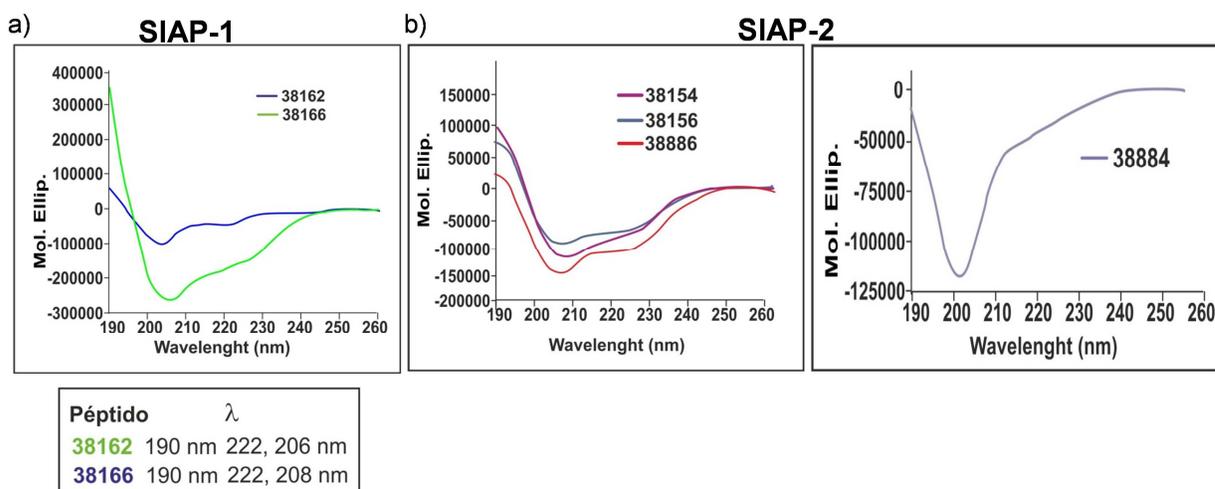


Figura 44. Espectros de DC en los cuales se observa el comportamiento estructural de los mHABPs. a) DC de **38162** y **38166** (SIAP-1); b) DC de **38154**, **38156**, **38884** y **38886** (SIAP-2).

7.3.3.1.2.2. ¹H-Resonancia Magnética Nuclear

Como se mencionó anteriormente se realizó la determinación de la estructura 3D de los mHABPs **38162** y **38166** derivados de SIAP-1 mediante esta técnica.

Asignamiento y asignación de NOEs secuenciales y de media distancia

El estudio de los espectros COSY y TOCSY permitió determinar el sistema de spin de cada aminoácido y el desplazamiento químico de cada hidrógeno presente en la cadena peptídica de los mHABPs **38162** y **38166**.

El estudio de los coeficientes de temperatura mostro que los péptidos tienen aminoácidos involucrados en enlace de hidrógeno, los cuales se observan en la figura 45, sugiriendo la presencia de regiones estructuradas en estas moléculas, lo que concuerda con lo mostrado por los espectros de DC.

Por medio del análisis de los espectros NOESY de los dos mHABPs, se encontró la secuencia peptídica debido a la presencia de NOES fuertes y medios del tipo $H\alpha_i-HN_{i+1}$, adicionalmente, se determinaron interacciones o “cross-peak” entre hidrógenos como consecuencia de efectos dipolares del tipo $(H\alpha_i-HN_{i+2})$, $(H\alpha_i-HN_{i+3})$, $(H\alpha_i-HN_{i+4})$ y $(H\alpha_i-H\beta_{i+3})$ (Figura 45), estos NOEs sugirieron la presencia de estructura secundaria del tipo α -hélice (75), lo cual se reafirma por los coeficientes bajos de temperatura en algunos de los aminoácidos que están involucrados en estos NOEs de medio rango y además estos resultados concuerdan con lo mostrado por los espectros de DC.

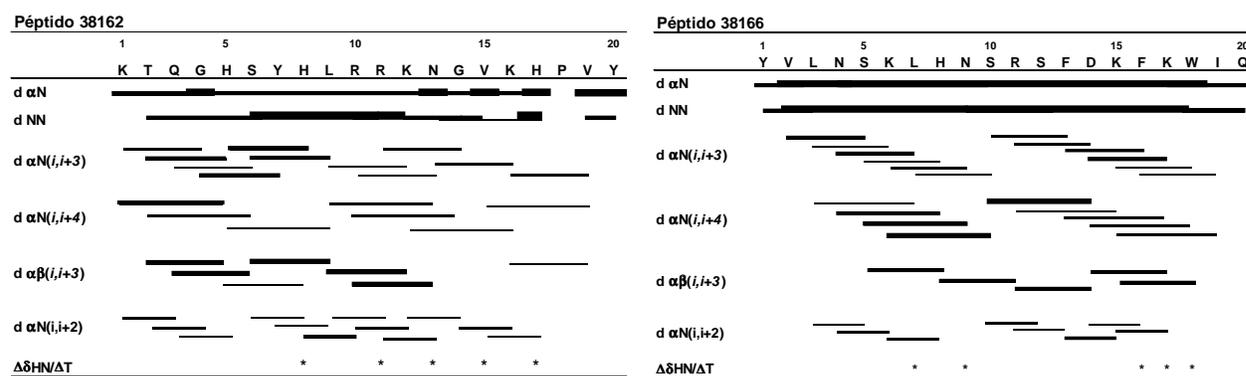


Figura 45. Resumen de conectividades secuenciales y de medio rango para **38162** y **38166**, el grosor de las barras está relacionado con la intensidad del NOE. Los valores menores a 4,5 en coeficiente de temperatura están indicados con asterisco en los aminoácidos que están involucrados en enlace de hidrógeno.

Entonces, como resultado de este análisis se obtuvo que el **38162** tiene una α -hélice entre los residuos T2-K16 y el **38166** muestra una región α -helical entre los aminoácidos L6-Q20, y los dos péptidos tienen una pequeña región flexible hacia el amino y carboxi terminal.

7.3.3.1.2.3. Cálculo de estructura

Como en los casos anteriores después de realizar varios cálculos para cada péptido, se seleccionó una familia de estructuras que cumplieran con los datos derivados de $^1\text{H-RMN}$ y el elemento estructural encontrado por esta técnica; adicionalmente, esta familia de conformeros poseen baja energía y en el momento de la superposición sobre la estructura consenso en la región estructurada los valores de RMSD fueron bajos, mostrando el buen ajuste de las estructuras seleccionadas en cada familia (Tabla 19), el análisis de los ángulos diedrales ϕ y ψ indicaron la presencia de regiones de α -hélice bien definidas para estos péptidos, entre T2-K16 para **38162** y entre L6-Q20 para **38166** (Figura 46), estos resultados corroboran lo obtenido del análisis por $^1\text{H-RMN}$; por lo tanto se afirma que la estructura secundaria preferencial de estos mHABPs son α -hélice.

Tabla 19. Resultado del cálculo de estructura para los mHABPs **38162** y **38166**

Péptido	Características estructurales	NOEs iniciales	Familia confor.	Superposición	RMSD	Máx. Viol. de NOE (Å)	Máx. Viol. de ángulo
38162	α -hélice T2-K16	189	15	T2-K16	0,28	0,40	2,0
38166	α -helix L6-Q20	243	15	N4-Q20	0,30	0,30	2,0

Familia confor: Número de estructuras seleccionadas en la familia

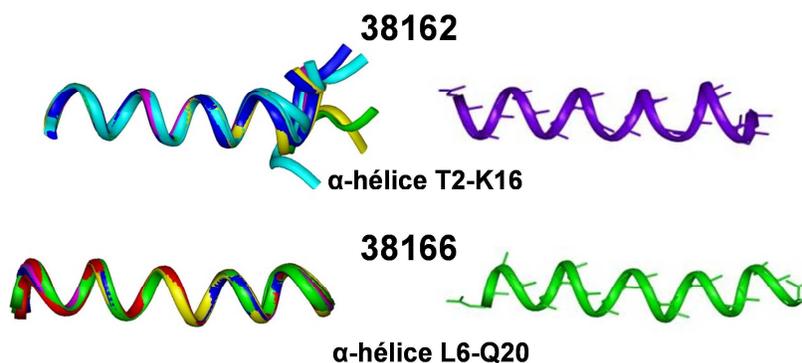


Figura 46. a) Familia de conformeros escogidos para **38162** y **38166**, b) estructura consenso (la de más baja energía y que cumplió con los datos obtenidos por $^1\text{H-RMN}$) de cada uno de los péptidos.

7.3.4. Estudios Inmunológicos

Como se mencionó en la sección de metodología, para evaluar el comportamiento inmunológico de los péptidos derivados de estas proteínas se utilizó el suero obtenido de los monos *Aotus* después de ser inmunizados con estos péptidos y las técnicas de ELISA, IFI y WB.

Entonces, los péptidos poliméricos modificados de los cHABPs 34893 y 34899 de SIAP-1 y 36879 de SIAP-2, cuyos números de identificación y secuencias se observan en la tabla 13, fueron inoculados en monos *Aotus*, además se tomaron muestras de sangre en días específicos (esquema de inmunización y sangría ver sección materiales y métodos de este escrito o ver la misma sección en el anexo 7) con las que se realizaron los análisis inmunológicos.

Lo que se observó es que solo los mHABPs **38162** (34893), **38166** (34899) de SIAP-1 y **38156** (36879) de SIAP-2 fueron inmunogénicos, por otro lado, vale la pena aclarar que a los cHABPs 34893 y 34899 de SIAP-1 y 36879 de SIAP-2 no se les determinó su inmunogenicidad ya que se sabe que estos son no inmunogénicos (3).

En la figura 2A del anexo 7 se observa que 2 de los 8 monos inmunizados con el mHABP **38162** tienen bajos anticuerpos de 1:80 en las dos primeras dosis, lo que podría sugerir una baja concentración de péptido inoculado, luego se observa que después de la tercera inmunización hay un aumento de estos anticuerpos a 1:160 debido posiblemente a que con cada dosis inoculada se va presentando una acumulación del péptido en el organismo, adicionalmente, como se sabe cuándo es reiterado el ingreso de un antígeno la intensidad de la respuesta inmune aumenta (126); mientras que **38166** después de las 3 inmunizaciones solo se observó respuesta en uno de los monos, el cual mostró bajos anticuerpos (1:80), lo que también puede estar relacionado con una baja concentración de péptido inoculado o la misma naturaleza del péptido, lo cual, como se sabe, estos dos puntos están relacionados con la intensidad y características de la respuesta inmunológica (126).

Por otro parte, existe un alto reconocimiento en 5 y en 6 de los 8 monos inmunizados con los mHABPs **38162** y **38166** respectivamente, del fragmento II de la proteína recombinante de SIAP-1 (rSIAP-1-RII) en el cual están localizados los péptidos 34893 y 34899, lo que fue evaluado por ELISA y se muestra en la figura 2C del anexo 7, también se observó que los anticuerpos inducidos contra **38162** y **38166** reaccionaron con rSIAP-

1-RII por WB reconociendo una banda de 42 kDa y otra de 35kDa, la cual probablemente fue un fragmento de clivaje después de la lisis de la bacteria (Figura 2D, anexo 7).

Mediante IFI del mHABP **38162** (SIAP-1) y de **38156** (SIAP-2) fue posible detectar pequeñas estructuras intracelulares (posiblemente micronemas), las cuales son reconocidas dentro de los esporozoítos (Figura 2A, anexo 7, fluorescencia roja). Además, se observó fluorescencia sobre la superficie de la membrana para ambos péptidos (Figura 47), de manera similar al patrón de fluorescencia que muestra el péptido modificado **24258** derivado de la proteína CSP (53) el cual se observa en fluorescencia verde (Figura 2A, anexo 7) que se sabe que reacciona con estructuras de membrana; esto sugiere la localización de SIAP-1 y SIAP-2 en los micronemas que luego debe ser transportada hacia la superficie del esporozoíto, este comportamiento también fue observado por Arévalo-Pinzón en 2011 (124) y por Siau en 2008 el cual sugirió que debido a su localización sobre la superficie del esporozoíto es una proteína involucrada en la invasión a la célula hospedera (122).

Por lo mencionado anteriormente, estos péptidos modificados derivados de SIAP-1 (**38162** y **38166**) y de SIAP-2 (**38156**) serían buenos candidatos para ser incluidos en una vacuna contra la malaria ya que podrían estar involucrados en el proceso de invasión.

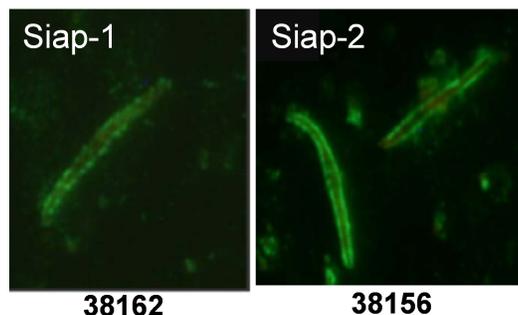


Figura 47. Inmunofluorescencia con sueros que tienen títulos de anticuerpos producidos en *Aotus* inmunizados con los mHABPs **38162** (SIAP-1) y **38156** (SIAP-2) mostrando reactividad sobre la superficie del esporozoíto.

Ahora bien, con respecto al comportamiento inmunológico del péptido modificado **38156** (36879) derivado de SIAP-2, se observó mediante IFI que en las dos primeras inmunizaciones uno de los ocho micos inoculados con él, tuvo anticuerpos de 1:80 y que después de la tercera dosis aumentaron a 1:160 (Figura 2A, anexo 7) (esto se puede

explicar de una manera similar al comportamiento de **38162** derivado de SIAP-1), asimismo, fue inmunogénico gracias a que hubo reconocimiento de la proteína recombinante de SIAP-2 (rSIAP-2) en el suero de 5 de los 8 micos inmunizados (Figura 2C, anexo 7).

El análisis del WB para **38156** reveló que el suero del mico que produjo anticuerpos reconoció una banda de 42 kDa que es el peso de rSIAP-2 y otra banda en 53 kDa (Figura 2D, anexo 7). Entonces, para conocer el posible origen de la banda de 53 kDa se evaluó por WB la reactividad de los sueros obtenidos de ratones inmunizados con dos mezclas de péptidos los cuales correspondían a epitopes B predichos por Bcepred, la mezcla A contenía péptidos localizados hacia el N-ter y la mezcla B péptidos localizados en el C-ter (124), lo que se observó fue que la mezcla A reaccionó exclusivamente con la banda de 53 kDa, mientras que la mezcla B reconoce las dos bandas la de 53 y 42 kDa (Figura 2D, anexo 7) como lo hace el suero de **38156**, sugiriendo que la reactividad del suero de este *Aotus* fue similar a la observada en dichos ratones. Adicionalmente, se puede sugerir que SIAP-2 con un peso mayor se debe posiblemente a interacciones no específicas entre la proteína y los residuos de carbohidratos de la resina de la columna de purificación (127) y se puede especular que estas interacciones son hacia el N-terminal ya que la mezcla A es la que reconoce la banda de 53 kDa.

7.3.5. Relación estructura-función

Respecto a la asociación entre la estructura que presentaron tanto los péptidos conservados como los péptidos modificados y su comportamiento inmunológico se tuvieron en cuenta varios aspectos: 1) las características estructurales de cada uno de los péptidos, 2) los resultados de inmunogenicidad, 3) unión por predicción a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH-II) que en el humano corresponde al antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés).

Ahora bien, como se mencionó anteriormente, el péptido conservado 34893 es no inmunogénico, mientras que su péptido modificado **38162** sí lo es. La diferencia en secuencia entre los dos péptidos es que se cambió L5 por H, L8 por H y T15 por V en **38162**, teniendo como consecuencia la modificación de la estructura, al comparar los dos péptidos, el 34893 tiene 2 fragmentos α -helicales entre L5-L8 y R10-G14 (Figura 43) mientras su modificado **38162** presentó un solo fragmento de α -hélice entre el T2-K16 (Figura 46), como se advierte la hélice aumentó de longitud en el péptido modificado.

Uno de los puntos que más llama la atención, es que justamente dos de los reemplazos de aminoácidos se realizaron tanto, en el residuo que inicia como en el que finaliza el primer segmento α -helical del 34893. Este cambio de L por H hacia la parte N-terminal del péptido modificado (**38162**) favoreció la elongación de la hélice desde el amino-terminal hasta la región central de la cadena peptídica, en lo cual probablemente colaboró la presencia de la histidina en esta región (N-ter), ya que según lo explica Richardson (86) en su libro, la presencia de histidina en la parte N-terminal favorece la formación de α -hélice más que la leucina. Por otra parte el reemplazo de T por V también indujo alargamiento de la hélice en dos residuos más hacia el C-ter lo que sucedió posiblemente por la presencia de la V, puesto que, este aminoácido favorece la formación de la hélice más que la treonina (115).

Para el caso de 34899 y **38166** la diferencia en secuencia es solo de un aminoácido de L8 por H, pero que logra disminuir la longitud de la α -hélice en el mHABP, ya que en el cHABP no inmunogénico 34899 la hélice abarca de V2 hasta Q20, mientras que la región helical en el mHABP **38166** está localizada entre los residuos K6-Q20, el efecto que tuvo la histidina en este péptido modificado fue contrario a lo que sucedió en **38162** quizás porque en **38166** no hubo sino un solo cambio y adicional a esto, dos residuos hacia el N-terminal de la histidina (H8) que esta protonada (por el pH al cual se realiza la determinación por $^1\text{H-RMN}$) se encuentra una lisina cargada positivamente (K6), entonces se puede sugerir que debido a la presencia de la carga positiva de K puede existir cierto grado de repulsión con la H y por lo tanto, se desestabilice la hélice hacia el N-ter, cuyo resultado sería el acortamiento de la longitud de la α -hélice.

Adicional a las modificaciones estructurales en estos péptidos como resultado de los reemplazos de los aminoácidos, también existen implicaciones biológicas asociadas a su comportamiento inmunológico, el cual se sugiere está relacionado con su unión a las moléculas del CMH-II (120), por consiguiente se realizó la predicción (NetMHCIIpan 3.0 sever (117)) del posible alelo HLA-DR β 1* al cual estos péptidos pueden unirse, para 34893 y **38162** el alelo más favorecido fue el HLA-DR β 1*0802, para 34899 y **38166** el alelo HLA-DR β 1*0302 fue el elegido, estos alelos fueron los escogidos debido a que los péptidos tienen los motivos y registros de unión característicos para estas moléculas (118, 128).

En consecuencia los 9 aminoácidos seleccionados como motivo y registro de unión para 34983 inician en Y7 (“pocket” 1, fucsia) y terminan en T15 (“pocket” 9, verde) y para **38162** se encuentran entre Y7 (“pocket” 1, fucsia) y V15 (“pocket” 9, verde) (Tabla 20).

Por otro lado, se ha determinado experimentalmente que la distancia entre “pocket” 1 y “pocket” 9 en el PBR de las moléculas del CMH-II para los alelos pertenecientes a DR52 como HLA-DRβ1* 03, 11 y 08 debe estar en el rango de $20 \pm 1.5 \text{ \AA}$ (3, 129) para que haya un buen ajuste de los mHABPs en el PBR de las moléculas CMH-II la distancia entre los átomos más distantes de los aminoácidos que ajustan en “pocket” 1 y “pocket” 9 debe estar en el rango anteriormente descrito, para que estos mHABPs sean inmunogénicos.

Entonces al medir la distancia entre el “pocket” 1 (Y7) y el “pocket” 9 (T15 o V15), se encontró que para 34893 fue de 18,03 Å mientras que para **38162** fue de 21,34 Å (Figura 3C, anexo 6), esta última distancia se encuentra en el rango permitido para un adecuado ajuste en el CMH-II.

Tabla 20. Registro de unión para 34893 y **38162** cuando ajustan en HLA-DRβ1*0802

Péptido/ pocket	Secuencia	Registro de	Distancia (Å)
		Unión	
		P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9	
34893	KVQGLSYLLRRKNGTKHPVY	YLLRRKNGT	18.03
38162	- - - - H - - H - - - - - V - - - - -	YHLRRKNGV	21.34

Al mismo tiempo, analizando la orientación de las cadenas laterales de estos 9 aminoácidos (Figura 3D, anexo 7) se encontró que la cadena de Y7 (“pocket” 1, fucsia), de R10 (“pocket” 4, azul oscuro) y K12 (“pocket” 6, anaranjado) (Tabla 20) tienen una mala orientación en 34893 y que por el contrario estas cadenas tienen la orientación correcta en **38162** (130). Del mismo modo, las cadenas de los residuos que deben hacer contacto con el RLT como L9 (posición 3, azul turquesa) y N13 (posición 7, gris) tienen una orientación no adecuada en 34893 mientras que en **38162** se observa su orientación apropiada (130).

En resumen, el hecho de que la distancia entre “pocket” 1 y 9 del mHABP **38162** fuera 3,31 Å más larga que la de 34893 y que las cadenas laterales de los “pockets” 1, 4, 6 las cuales hacen un buen contacto con el PBR de CMH-II y las cadenas de las posiciones 3 y

7 estuvieran en la orientación apropiada para interactuar con el RLT, lograron convertir el **38162** en un péptido inmunogénico.

Ahora bien, como se mencionó 34899 y **38166** mostraron tener motivos de unión para HLA-DRβ1*0302, lo cual permitió definir que el registro de unión para ambos péptidos inicia en el aminoácido L7 (“pocket” 1, fucsia) y finaliza en K15 (“pocket” 9, verde) (Tabla 21); y que al realizar un análisis igual a lo anteriormente descrito para 34893 y **38162**, se encontró que la distancia que hay entre los átomos distantes de “pocket” 1 y 9 para 34899 es de 18,02 Å (Figura 3C, anexo 7) y de 19,43 Å para su modificado **38166**, esta distancia se encuentra en el rango propuesto por Patarroyo en 2011 de $\sim 20 \pm 1.5$ Å para mHABPs (péptidos inmunogénicos) cuyo registro de unión es el adecuado para el alelo HLA-DRβ1*03 (3), lo que sugiere que **38166** tiene un mejor ajuste en el PBR del CMH-II que 34899. En cuanto a la orientación de las cadenas laterales de los 9 aminoácidos del registro de unión la mayor diferencia se observa en K15 correspondiente al “pocket” 9 (verde), encontrándose mal orientada en 34899 y bien orientada en **38166** (130) (Figura 3D, anexo 7).

Teniendo en cuenta que la modificación de L8H influyo en la longitud de la región helical de **38166**, que la distancia entre “pocket” 1 y 9 es 1,41 Å mayor en **38166** y que la orientación de sus cadenas laterales en el registro de unión en el PBR es aceptable, convirtieron a este péptido en inmunogénico inductor de anticuerpos.

Tabla 21. Registro de unión para 34899 y 38166 cuando ajustan en HLA-DRβ1*0302.

Péptido/ pocket	Secuencia	Registro de	Distancia (Å)
		Unión	
		P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9	
34899	YVL NSKLLNSRSFDKFKWIQ	L L N S R S F D K	18.02
38166	-----H-----	L H N S R S F D K	19.43

Por otro lado, Bermúdez y colaboradores en 2014 (130) cuando realizaron ensayos de inmunización en monos *Aotus* con mezclas de péptidos modificados los cuales individualmente eran inmunogénicos, observaron un fenómeno que está relacionado con la orientación de la cadena lateral del residuo que se encuentra en la posición 3 (apuntando hacia el RLT) de la secuencia de unión al PBR, esta orientación puede ser *gauche+* o *gauche-*. Cuando era *gauche+* ellos observaron una fuerte actividad inmunogénica (producción de anticuerpos) en la mezcla, por el contrario cuando dicha

orientación fue *gauche-* se perdía completamente esta actividad, lo que sugiere que la orientación de la cadena del residuo en la posición 3 (*gauche+*) es importante.

Por tal razón, para estudiar la orientación de esta cadena lateral en los mHABPs inmunogénicos **38162** y **38166** se analizó el valor de los ángulos χ_1 (Tabla 22), en verde se resalta el valor de χ_1 para el aminoácido de la posición 3) y lo que se vio es que ambos tiene valores en el rango de -120° a 0 , rango que define la orientación o el rotamero *gauche+* (131), por lo tanto al tener esta orientación lo más probable es que este residuo presente una interacción apropiada con el RLT; además, posiblemente son péptidos que podrían ser usados en ensayos de inmunización en mezclas con otros mHABPs, ya que no van a causar ningún tipo de interferencia negativa o bloqueo de la respuesta inmune.

Tabla 22. Valor del ángulo χ_1 para los péptidos modificados **38162** y **38166** de los aminoácidos que ajustan en el PBR.

38162			38166		
P	AA	χ_1	P	AA	χ_1
1	Y	-166,5	1	L	-65,4
2	H	-166,8	2	H	-163,1
3	L	-82,8	3	N	-117,6
4	R	-64,1	4	S	-72,4
5	R	-171,1	5	R	54,7
6	K	-159,7	6	S	-171,1
7	N	-67,9	7	F	-81,7
8	G		8	D	-167,8
9	V	-144,3	9	K	-167,2

P:posición; AA:aminoácido

En síntesis los péptidos modificados **38162** y **38166** los cuales se obtuvieron por los cambios de aminoácidos realizados en sus péptidos nativos 34893 y 34899 respectivamente, son inmunogénicos debido a su capacidad de producir anticuerpos contra el parásito, gracias a un apropiado ajuste de estos péptidos en las moléculas CHM-II y por tanto una buena presentación al RLT, lo que conlleva a la formación y estabilización del complejo trimolecular CMH II-péptido-RLT uno de los responsables de la respuesta inmune (132, 133).

Estos resultados sugieren que estos mHABPs pueden ser blancos potenciales para ser incluidos como componentes de una vacuna basada en subunidades sintetizadas químicamente, multi-epitope y multi-estadio contra la malaria.

Sin embargo, los anticuerpos producidos por estos mHABPs son bajos (Figura 2, anexo 7), lo cual puede posiblemente atribuirse a que son muy estructurados (α -hélice) en el motivo y registro de unión al PBR del CMH-II, ya que como se ha reportado para tener una mejor estabilización del complejo bimolecular CMH II-péptido, la conformación del péptido que se favorece en el surco de unión del CMH-II está asociada con la estructura tipo poliprolina II ($PPII_L$) (134) la cual tiene ángulos de torsión para $\phi = -75 \pm 20^\circ$ y para $\psi = 145 \pm 25^\circ$ (135), los cuales aseguran un perfecto ajuste en CMH-II gracias a la formación de varios enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals entre el oxígeno y el nitrógeno del backbone del péptido con la cadena lateral de aminoácidos conservados de las cadenas α y β del CMH-II (1, 116) para inducir una alta respuesta inmunológica (120). Entonces lo que se propone es que se deben seguir haciendo modificaciones en los aminoácidos críticos en la unión al CMH-II tratando de buscar que la conformación del péptido resultante sea o tienda a ($PPII_L$), o que se produzca un acortamiento en la α -hélice dejando regiones más flexibles en los péptidos para mejorar el ajuste de estos en el PBR del CMH-II.

7.4. Conclusiones

Por medio del estudio de DC, 1H -RMN y cálculo de estructura se determinó la estructura secundaria preferencial para péptidos nativos y modificados derivados de las proteínas SIAP-1 y SIAP-2

El análisis por 1H -RMN y cálculo de estructura muestra que ciertos cambios en residuos específicos de la secuencia de los péptidos nativos (no inmunogénicos) modifican la estructura tridimensional del mismo, de tal modo que convierte los nuevos péptidos modificados en inmunogénicos.

Los resultados sugieren con respecto a los péptidos modificados: que una estructura adecuada, la orientación apropiada de las cadenas laterales de los residuos que ajustan en el PBR del CMH-II, la distancia justa entre los residuos de los "pockets" 1 y 9, la

conformación de la cadena lateral del aminoácido en posición 3 sea *gauche+*, permiten a los péptidos modificados un mejor ajuste en el CMH-II favoreciendo la formación adecuada del complejo trimolecular CMH II-péptido-RLT y por lo tanto el inicio de una respuesta inmune.

Existe una relación entre la estructura 3D que adoptan los péptidos inductores de anticuerpos con su actividad inmunológica.

Se sugiere que los mHABPs **38162** y **38166** pueden ser blancos potenciales para ser incluidos como componentes de una vacuna basada en subunidades sintetizadas químicamente, multi-epitope y multi-estadio contra la malaria.

Los resultados de este capítulo generaron una publicación la cual se encuentra en el anexo 7:

Alba MP, Almonacid H, Calderón D, Chacón EA, Poloche LA, Patarroyo MA, Patarroyo ME. 3D structure and immunogenicity of Plasmodium falciparum sporozoite induced associated protein peptides as components of fully-protective anti-malarial vaccine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. 416: 349-355.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Las proteínas SPECT-1 y -2 y SIAP-1 y -2 son importantes para la supervivencia del parásito debido a que están involucradas en el paso a través de las células del hospedero humano y en la invasión del *Plasmodium* a la célula hepática. En este estudio, se encontró que algunos cHABPs 33372, 33375, 34936, y 34938 pertenecientes a las proteínas SPECT-1 y -2, están posiblemente involucrados con la unión y formación de poros sobre la membrana de las células hospederas, ayudando al esporozoíto a abrirse paso a través de las células “cell-traversal” del hospedero y así alcanzar las células hepáticas. Esta función de las proteínas SPECT-1 y -2 y de SIAP-1 y -2 las hace blancos antigénicos para ser incluidas en el desarrollo de una alternativa eficaz para controlar la malaria como lo es la vacuna sintética, multi-epitope y multi-estadio que se viene desarrollando en nuestro instituto, la cual incluye péptidos modificados derivados de péptidos conservados de alta capacidad de unión (cHABPs) a las células hospederas ya que estos son blancos antigénicos debido a la función que tienen durante la infección, razón por la cual son no inmunogénicos. Para cambiar este comportamiento inmunológico se reemplazaron ciertos aminoácidos críticos del cHABP convirtiendo los nuevos péptidos en inmunogénicos.

En este trabajo se encontró que al realizar los cambios en aminoácidos específicos, el resultado obtenido fue una modificación en la estructura de dichos péptidos, como por ejemplo: el acortamiento de regiones helicales como en **38166** (34899, SIAP-1), la presencia de hélices cortas como lo observado en **38150** (33375, SPECT-1) y **38890** (34938, SPECT-2), la presencia de estructuras PPII_L acompañada de regiones helicales cortas como en **38128** (34949, SPECT-2). Estos cambios estructurales están relacionados con el hecho de que estos péptidos modificados se conviertan en inmunogénicos, lo cual tiene que ver con un ajuste adecuado de estos péptido sobre el PBR de las moléculas CMH II. Este ajuste involucra varios aspectos, como son: que los péptidos modificados tienen el registro y motivo de unión correcto para las moléculas HLADRβ1*, una distancia apropiada entre el aminoácido que entra en el “pocket” 1 y el “pocket” 9, una adecuada orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos que hacen contacto con los CDRs del RLT, todo esto junto conlleva a que ocurra la formación y estabilización del complejo trimolecular CMH II-peptido-RLT, uno de los desencadenantes de la respuesta inmunitaria. Lo anterior sugiere que los mHABPs pueden ser blancos potenciales para ser incluidos como componentes de una vacuna contra la malaria.

En resumen, al comparar la estructura secundaria mostrada por los cHABPs no inmunogénicos con la estructura de los mHABPs inductores de anticuerpos, se observa la existencia de una relación entre la estructura de dichos péptidos con su actividad inmunológica, lo que permite avanzar en el diseño racional de vacunas eficaces químicamente sintetizadas, multi-epitope y multi-estadio.

9. PERSPECTIVAS

Los mHABPs pertenecientes a las proteínas SPECTs y SIAPs que individualmente son inmunogénicos deben ser incluidos junto con otros mHABPs relevantes en la respuesta inmune, en una mezcla de péptidos que debe ser inoculada en el modelo animal (mono *Aotus*) con el fin de estudiar su comportamiento inmunológico.

Diseñar nuevos péptidos modificados a partir de los péptidos que produjeron anticuerpos.

Para obtener péptidos con una mejor respuesta inmune, se recomienda realizar ensayos de unión de los péptidos modificados a moléculas HLADR β 1*. Porque sabiendo cual es el alelo de mayor afinidad se pueden realizar nuevos reemplazos de aminoácidos en los péptidos, con la finalidad de obtener un mejor ajuste de estos en las posiciones específicas de interacción con los “pockets” 1, 4, 6 y 9, lo que permitirá una mayor interacción entre el péptido y el surco de unión del CMH clase II, lo que conllevará a una mejor presentación al RLT.

Evaluar la respuesta inmunitaria mediante la medición de citoquinas en los sueros de los monos *Aotus* inmunizados con los mHABPs que indujeron anticuerpos en el modelo animal.

Diseñar péptidos modificados a partir de los otros cHABPs que no se estudiaron aquí y estudiarlos a nivel estructural e inmunológico, para encontrar otros péptidos potenciales a ser incluidos en la vacuna que se desarrolla en la FIDIC.

10. ARTÍCULOS COMPLEMENTARIOS

Durante el periodo de tiempo en el cual se desarrolló este trabajo de investigación, se generaron otras publicaciones que si bien, no están relacionados directamente con péptidos derivados de las proteínas involucradas en este estudio, contribuyen al conocimiento de la biología del parásito, a la búsqueda de nuevos blancos antigénicos y a establecer nuevas reglas que permiten día a día avanzar en el desarrollo de la vacuna químicamente sintetizada, multi-epitope y multi-estadio que se viene desarrollando en la FIDIC contra la malaria. El trabajo de investigación relacionado con estas publicaciones ayudó tanto a mi formación académica como la de investigador.

A continuación se presenta un resumen de estas publicaciones y en el capítulo de anexos se encuentran los artículos completos.

1. Patarroyo ME, **Alba MP**, Reyes C, Rojas-Luna R, Patarroyo MA. The Malaria Parasite's Achilles' Heel: Functionally-relevant Invasion Structures. *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2015. 18:11-20. Anexo 6.

Abstract

“Malaria parasites have their Achilles' heel; they are vulnerable in small parts of their relevant molecules where they can be wounded and killed. These are sporozoite and merozoite protein conserved high activity binding peptides (cHABPs), playing a critical role in binding to and invasion of host cells (hepatocytes and erythrocytes, respectively). cHABPs can be modified by specific amino acid replacement, according to previously published physicochemical rules, to produce analogues (mHABPs) having left-handed polyproline II (PPIIL)-like structures which can modulate an immune response due to fitting perfectly into the HLA-DR β 1* peptide binding region (PBR) and having an appropriate presentation to the T-cell receptor (TCR).”

2. Patarroyo ME, **Alba MP**, Curtidor H, Vanegas M, Almonacid H, Patarroyo MA. Using the PfEMP1 head structure binding motif to deal a blow at severe malaria. *PLoS One.* 2014. 9:e88420. (Anexo 8)

Abstract

"*Plasmodium falciparum* (*Pf*) malaria causes 200 million cases worldwide, 8 million being severe and complicated leading to ~1 million deaths and ~100,000 abortions annually. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*) has been implicated in cytoadherence and infected erythrocyte rosette formation, associated with cerebral malaria; chondroitin sulphate-A attachment and infected erythrocyte sequestration related to pregnancy-associated malaria and other severe forms of disease. An endothelial cell high activity binding peptide is described in several of this ~300 kDa hypervariable protein's domains displaying a conserved motif (GACxPxRRxxLC); it established H-bonds with other binding peptides to mediate red blood cell group A and chondroitin sulphate attachment. This motif (when properly modified) induced *PfEMP1*-specific strain-transcending, fully-protective immunity for the first time in experimental challenge in Aotus monkeys, opening the way forward for a long sought-after vaccine against severe malaria."

3. Patarroyo ME, Bermudez A, **Alba MP**. The high immunogenicity induced by modified sporozoites' malarial peptides depends on their phi (ϕ) and psi (ψ) angles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. 429: 81-86. (Anexo 9)

Abstract

"The importance of CSP- and STARP-derived ϕ and ψ dihedral angles in mHABP structure was analysed by $(1)H$ NMR in the search for molecules which can be included as components of a first-line-of-defence *Plasmodium falciparum* sporozoite multi-epitope vaccine against the most lethal form of human malaria. Most of the aforementioned dihedral angles were left-hand-like polyproline type II (PPII(L)) structures whilst others had right-hand-like α -helix ($\alpha(R)$), thus allowing mHABPS to fit better into MHCII molecules and thereby form an appropriate pMHCII complex and also establish the H-bonds which stabilise such complex and by this means induce an appropriate immune response. This information has great implications for vaccine development, malaria being one of them."

4. Curtidor H, Vanegas M, **Alba MP**, Patarroyo ME. Functional, immunological and three-dimensional analysis of chemically synthesised sporozoite peptides as components of a fully-effective antimalarial vaccine. *Curr. Med. Chem.* 2011. 18:4470-4502. (Anexo 10)

Abstract

“Our ongoing search for a fully-effective vaccine against the *Plasmodium falciparum* parasite (causing the most lethal form of human malaria) has been focused on identifying and characterising proteins' amino acid sequences (high activity binding peptides or HABPs) involved in parasite invasion of red blood cells (RBC) by the merozoite and hepatocytes by the sporozoite. Many such merozoite HABPs have been recognised and molecularly and structurally characterised; however, native HABPs are immunologically silent since they do not induce any immune response or protection against *P. falciparum* malaria infection and they have to be structurally modified to allow them to fit perfectly into immune system molecules. A deeply structural analysis of these conserved merozoite HABPs and their modified analogues has led to rules or principles becoming recognised for constructing a logical and rational methodology for a minimal subunit-based, multi-epitope, multi-stage, chemically-synthesised vaccine. The same in-depth analysis of the most relevant sporozoite proteins involved in sporozoite cell-traversal and hepatocyte invasion as well as the hepatic stage is shown here. Specifically modifying these HABPs has resulted in a new set of potential pre-erythrocyte targets which are able to induce high, long lasting antibody titres in Aotus monkeys, against their corresponding recombinant proteins and the complete parasite native molecules. This review shows how these rules may be applied against the first stage of parasite invasion (i.e. the sporozoite) to mount the first line of defence against the malarial parasite, which may indeed be the most effective one. Our results strongly support including some of these modified sporozoite HABPs in combination with the previously-described modified merozoite HABPs for obtaining the aforementioned fully-protective, multiepitope, multi-stage, minimal subunit-based, chemically-synthesized, antimalarial vaccine”.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Murthy VL, Stern LJ. The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. *Structure*. 1997;5(10):1385-96. Epub 1997/11/14.
2. Chia WN, Goh YS, Renia L. Novel approaches to identify protective malaria vaccine candidates. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:586. Epub 2014/12/03.
3. Patarroyo ME, Bermudez A, Patarroyo MA. Structural and immunological principles leading to chemically synthesized, multiantigenic, multistage, minimal subunit-based vaccine development. *Chem Rev*. 2011;111(5):3459-507. Epub 2011/03/29.
4. Doolan DL. Plasmodium immunomics. *International journal for parasitology*. 2011;41(1):3-20. Epub 2010/09/08.
5. Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(5):404-14. Epub 2007/05/03.
6. Rodriguez LE, Curtidor H, Urquiza M, Cifuentes G, Reyes C, Patarroyo ME. Intimate molecular interactions of *P. falciparum* merozoite proteins involved in invasion of red blood cells and their implications for vaccine design. *Chem Rev*. 2008;108(9):3656-705. Epub 2008/08/20.
7. Puentes A, Garcia J, Vera R, Lopez R, Suarez J, Rodriguez L, et al. Sporozoite and liver stage antigen Plasmodium falciparum peptides bind specifically to human hepatocytes. *Vaccine*. 2004;22(9-10):1150-6. Epub 2004/03/09.
8. Curtidor H, Vanegas M, Alba MP, Patarroyo ME. Functional, immunological and three-dimensional analysis of chemically synthesised sporozoite peptides as components of a fully-effective antimalarial vaccine. *Curr Med Chem*. 2011;18(29):4470-502. Epub 2011/10/28.
9. Cifuentes G, Bermudez A, Rodriguez R, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Shifting the polarity of some critical residues in malarial peptides' binding to host cells is a key factor in breaking conserved antigens' code of silence. *Med Chem*. 2008;4(3):278-92. Epub 2008/05/14.
10. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Acc Chem Res*. 2008;41(3):377-86. Epub 2008/02/13.

11. Patarroyo ME, Alba MP, Curtidor H. Biological and structural characteristics of the binding peptides from the sporozoite proteins essential for cell traversal (SPECT)-1 and -2. *Peptides*. 2011;32(1):154-60. Epub 2010/10/12.
12. Espejo F, Bermudez A, Torres E, Urquiza M, Rodriguez R, Lopez Y, et al. Shortening and modifying the 1513 MSP-1 peptide's alpha-helical region induces protection against malaria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(2):418-27. Epub 2004/02/10.
13. Alba MP, Salazar LM, Vargas LE, Trujillo M, Lopez Y, Patarroyo ME. Modifying RESA protein peptide 6671 to fit into HLA-DRbeta1* pockets induces protection against malaria. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;315(4):1154-64. Epub 2004/02/27.
14. Bermudez A, Alba MP, Vanegas M, Patarroyo ME. 3D structure determination of STARP peptides implicated in *P. falciparum* invasion of hepatic cells. *Vaccine*. 2010;28(31):4989-96. Epub 2010/06/29.
15. Sinnis P, Coppi A. A long and winding road: the Plasmodium sporozoite's journey in the mammalian host. *Parasitol Int*. 2007;56(3):171-8. Epub 2007/05/22.
16. Menard R, Heussler V, Yuda M, Nussenzweig V. Plasmodium pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol*. 2008;24(12):564-9. Epub 2008/10/22.
17. Lanaspá M, Reno, M., Bassata, Q. ¿qué hay de nuevo acerca de esta vieja enfermedad? *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2010;12:685-700.
18. Wongsrichanalai C, Sibley CH. Fighting drug-resistant Plasmodium falciparum: the challenge of artemisinin resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(10):908-16. Epub 2013/09/17.
19. Tobón A, Giraldo C, Pineros J, Arboleda M, Blair S, Carmona-Fonseca J. The epidemiology of complicated falciparum malaria: case and controls study in Tumaco and Turbo, Colombia, 2003. *Rev Bras Epidemiol*. 2006;9(3):283-96.
20. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012;379(9814):413-31. Epub 2012/02/07.
21. Malaria site. www.malariesite.com/malaria. Consultada Febrero 9 de 2015.
22. Chavez MI. Aplicaciones de la RMN al estudio de la estructura de lectinas vegetales y de sus interacciones con oligosacáridos. Una visión 3D de dominios de

Heveína modificados y de una lectina específica del tomate.: Universidad Autónoma de Madrid; 2006.

23. Tobón A, Piñeros JG, Blair S, Carmona-Fonseca J. Clínica de la malaria complicada debida a *P. falciparum*. Estudio de casos y controles en Tumaco y Turbo (Colombia). IATREIA. 2006;19(4):339-55.

24. Zambrano P, Mercado M. Vigilancia y análisis de riesgo en salud pública. Protocolo de vigilancia en salud pública. Malaria. Instituto Nacional de Salud; 2014. p. 1-25.

25. Pabon A, Lopera T, Carmona J, Blair S. Evaluation of mutagenic activity of several antimalarial extracts from *Eupatorium inulaefolium*. Pharmazie. 2001;56(5):412-4. Epub 2001/06/13.

26. SIVIGILA. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 50 de 2014. www.ins.gov.co. Consultada Febrero de 2015.

27. Informe anual proyecto malaria. Colombia. Enero-Diciembre de 2012.

28. Sherman I. Malaria. Parasite biology, pathogenesis and protection. Irwin Sherman ed. Microbiology ASf, editor1998.

29. Sherman I. Plasmodium. Sciences EoL, editor2001. 1-6 p.

30. Coombs G. Biochemical protozoology. Ltd TF, editor1999.

31. Tavares J, Amino R, Menard R. The role of MACPF proteins in the biology of malaria and other apicomplexan parasites. Sub-cellular biochemistry. 2014;80:241-53. Epub 2014/05/07.

32. Patarroyo ME. RI desarrollo de una vacuna antimalárica. Tribuna Médica. 1989;80:2-11.

33. Sherman I. Molecular approaches to malaria. Sherman Ebl, editor: ASM Press. American Society for Microbiology; 2005.

34. Rodríguez-López MH. Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. Rev Biomed. 2008;19:61-79.

35. Kappe SH, Buscaglia CA, Nussenzweig V. Plasmodium sporozoite molecular cell biology. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:29-59. Epub 2004/10/12.

36. Boulter-Bitzer JI, Lee H, Trevors JT. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. Biotechnol Adv. 2007;25(1):13-44. Epub 2006/10/24.

37. Kaiser K, Camargo N, Coppens I, Morrissey JM, Vaidya AB, Kappe SH. A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin

(MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;133(1):15-26. Epub 2003/12/12.

38. Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends in cell biology.* 2004;14(10):528-32. Epub 2004/09/29.

39. Baum J, Gilberger TW, Frischknecht F, Meissner M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from Plasmodium and Toxoplasma. *Trends Parasitol.* 2008;24(12):557-63. Epub 2008/10/07.

40. Casanova N. Estudio del movimiento del parásito Plasmodium falciparum en estado de merozoito. Santiago-Chile: Universidad de Santiago de Chile; 2010.

41. Striepen B, Jordan CN, Reiff S, van Dooren GG. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS pathogens.* 2007;3(6):e78. Epub 2007/07/03.

42. Patarroyo ME, Cifuentes G, Rodriguez R. Structural characterisation of sporozoite components for a multistage, multi-epitope, anti-malarial vaccine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(3):543-57. Epub 2007/11/13.

43. Salazar LM, Bermudez A, Patarroyo ME. HLA-DR allele reading register shifting is associated with immunity induced by SERA peptide analogues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372(1):114-20. Epub 2008/05/17.

44. Bermudez A, Alba P, Espejo F, Vargas LE, Parra C, Rodriguez R, et al. Fitting modified HRP-I peptide analogue 3D structure into HLA-DR molecules induces protection against Plasmodium falciparum malaria. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(2):336-49. Epub 2004/10/12.

45. Cubillos M, Salazar LM, Torres L, Patarroyo ME. Protection against experimental P falciparum malaria is associated with short AMA-1 peptide analogue alpha-helical structures. *Biochimie.* 2002;84(12):1181-8. Epub 2003/03/12.

46. Cifuentes G, Guzman F, Alba MP, Salazar LM, Patarroyo ME. Analysis of a Plasmodium falciparum EBA-175 peptide with high binding capacity to erythrocytes and their analogues using ¹H NMR. *J Struct Biol.* 2003;141(2):115-21. Epub 2003/03/05.

47. Vignali M, Speake C, Duffy PE. Malaria sporozoite proteome leaves a trail. *Genome Biol.* 2009;10(4):216. Epub 2009/05/14.

48. Munter S, Sabass B, Selhuber-Unkel C, Kudryashev M, Hegge S, Engel U, et al. Plasmodium sporozoite motility is modulated by the turnover of discrete adhesion sites. *Cell Host Microbe.* 2009;6(6):551-62. Epub 2009/12/17.

49. Moreira CK, Templeton TJ, Lavazec C, Hayward RE, Hobbs CV, Kroeze H, et al. The Plasmodium TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites. *Cell Microbiol.* 2008;10(7):1505-16. Epub 2008/03/19.
50. Gruner AC, Brahimi K, Eling W, Konings R, Meis J, Aikawa M, et al. The Plasmodium falciparum knob-associated PfEMP3 antigen is also expressed at pre-erythrocytic stages and induces antibodies which inhibit sporozoite invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;112(2):253-61. Epub 2001/02/27.
51. Ishino T, Chinzei Y, Yuda M. Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol Microbiol.* 2005;58(5):1264-75. Epub 2005/11/30.
52. Garcia JE, Puentes A, Patarroyo ME. Developmental biology of sporozoite-host interactions in Plasmodium falciparum malaria: implications for vaccine design. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(4):686-707. Epub 2006/10/17.
53. Bermudez A, Vanegas M, Patarroyo ME. Structural and immunological analysis of circumsporozoite protein peptides: a further step in the identification of potential components of a minimal subunit-based, chemically synthesised antimalarial vaccine. *Vaccine.* 2008;26(52):6908-18. Epub 2008/10/22.
54. Fidock DA, Bottius E, Brahimi K, Moelans, II, Aikawa M, Konings RN, et al. Cloning and characterization of a novel Plasmodium falciparum sporozoite surface antigen, STARP. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;64(2):219-32. Epub 1994/04/01.
55. Cifuentes G, Vanegas M, Martinez NL, Pirajan C, Patarroyo ME. Structural characteristics of immunogenic liver-stage antigens derived from P. falciparum malarial proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384(4):455-60. Epub 2009/05/09.
56. Kurtis JD, Hollingdale MR, Luty AJ, Lanar DE, Krzych U, Duffy PE. Pre-erythrocytic immunity to Plasmodium falciparum: the case for an LSA-1 vaccine. *Trends Parasitol.* 2001;17(5):219-23. Epub 2001/04/27.
57. Curtidor H, Garcia J, Vanegas M, Puentes F, Forero M, Patarroyo ME. Identification of peptides with high red blood cell and hepatocyte binding activity in the Plasmodium falciparum multi-stage invasion proteins: PfSPATR and MCP-1. *Biochimie.* 2008;90(11-12):1750-9. Epub 2008/10/04.
58. Ejigiri I, Sinnis P. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. *Current opinion in microbiology.* 2009;12(4):401-7. Epub 2009/07/18.

59. Clyde DF. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1975;24(3):397-401. Epub 1975/05/01.
60. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature*. 1967;216(5111):160-2. Epub 1967/10/14.
61. Perlaza BL, Zapata C, Valencia AZ, Hurtado S, Quintero G, Sauzet JP, et al. Immunogenicity and protective efficacy of Plasmodium falciparum liver-stage Ag-3 in Aotus lemurinus griseimembra monkeys. *European journal of immunology*. 2003;33(5):1321-7. Epub 2003/05/06.
62. Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins LLC. CP, editor. BocaRaton, Florida (USA)1997.
63. Merrifield B. Solid phase synthesis. *Science*. 1986;232(4748):341-7. Epub 1986/04/18.
64. Merrifield B. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Methods in enzymology*. 1997;289:3-13. Epub 1997/01/01.
65. Fields CG, Fields GB, Noble RL, Cross TA. Solid phase peptide synthesis of 15N-gramicidins A, B, and C and high performance liquid chromatographic purification. *International journal of peptide and protein research*. 1989;33(4):298-303. Epub 1989/04/01.
66. Kates SA, Albericio F. Solid-phase synthesis. A practical guide2000.
67. Tam JP, Heath WF, Merrifield RB. SN 1 and SN 2 mechanisms for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. *International journal of peptide and protein research*. 1983;21(1):57-65. Epub 1983/01/01.
68. Urquiza M, Rodriguez LE, Suarez JE, Guzman F, Ocampo M, Curtidor H, et al. Identification of Plasmodium falciparum MSP-1 peptides able to bind to human red blood cells. *Parasite immunology*. 1996;18(10):515-26. Epub 1996/10/01.
69. Pradel G, Garapaty S, Frevert U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol*. 2002;45(3):637-51. Epub 2002/07/26.
70. Greenfield NJ. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical biochemistry*. 1996;235(1):1-10. Epub 1996/03/01.
71. Arboledas D. Jerarquia estructural de proteínas. Universitario. EC, editor2011.

72. Río Portilla JF. Determinación de la estructura de proteínas por resonancia magnética nuclear. Mensaje Bioquímico (Instituto de Química, UNAM). 2003;XXVII:65-83.
73. Banci L, Bertini I, Luchinat C, Mori M. NMR in structural proteomics and beyond. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2010;56(3):247-66. Epub 2010/07/17.
74. Kwan AH, Mobli M, Gooley PR, King GF, Mackay JP. Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. The FEBS journal. 2011;278(5):687-703. Epub 2011/01/11.
75. Wüthrich K. NMR of proteins and nucleic acids. Sons. JWa, editor. New York, USA1986.
76. Lian LY, Roberts G. Protein NMR spectroscopy: practical techniques and applications. Ltd. JWS, editor2011.
77. Nathan PJ. Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear: Limusa-Wiley.; 1970.
78. Ravera E, Salmon L, Fragai M, Parigi G, Al-Hashimi H, Luchinat C. Insights into domain-domain motions in proteins and RNA from solution NMR. Acc Chem Res. 2014;47(10):3118-26. Epub 2014/08/26.
79. Jiménez MA, Nieto, J.L., Rico, M. Péptidos en biología y biomedicina:Determinación estructural de péptidos por RMN. España: Raycar S.A. Impresores; 1997.
80. Rance M, Sorensen OW, Bodenhausen G, Wagner G, Ernst RR, Wuthrich K. Improved spectral resolution in cosy 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. Biochem Biophys Res Commun. 1983;117(2):479-85. Epub 1983/12/16.
81. Bax A, Davis, D.G. MLEV-17 based two dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. Journal Magnetic Resonance. 1985;65:355-60.
82. Jeener J, Meier, B.H., Backman, P. Ernst, R.R. . Investigation of enhance processes by two dimensional NMR spectroscopy. J Chem Phys. 1979;71:4546-53.
83. Crippen GM, Havel, T. . Distance Geometry and Molecular Conformation. Press RS, editor. Taunton (England): Research Studies Press; 1988.
84. Torda AE, Gunsteren, W.F. Reviews in Computational Chemistry. Publishers V, editor. New York: VCH Publishers; 1992.
85. Hore PJ. Nuclear Magnetic Resonance. Press OU, editor. New York: Oxford University Press 1995.
86. Richardson JS, Richardson, D.C. . Principles and Patterns of Protein Conformation, in Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation. Plenum GBF, editor. New York G.B. Fasman Plenum; 1989.

87. González A. Principios de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Técnicas Inmunoquímicas. Elsevier, editor: Elsevier; 2010.
88. Voet DaV, t J. . Biochemistry. Inc JWaS, editor: John Wiley and Sons Inc; 2004.
89. Mijan A. Técnicas y métodos de Investigación. Glosa E, editor: Ed. Glosa; 2002.
90. www.cultek.com. Cultek. 2015 [1-marzo-2015].
91. Garay Pérez HE. Síntesis de péptidos modificados químicamente con posibles aplicaciones farmacéuticas: Universidad de la Habana; 2012.
92. Pérez Escoda MT. Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV): Universidad de Barcelona; 2007.
93. Calvo JC, Barrera, Nubia. F., García, Josué. A., Guzman, Fanny. Espejo, Fabiola. Patarroyo. Manuel E. . Síntesis de oxitocina en fase sólida usando derivados de terbutoxicarbonilo y fluorenilmetoxicarbonilo. Revista Colombiana de Química. 1999;28:19-25.
94. Tam JP, Wu, C.R, Liu, W., Zhang, J.W. . Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. J Am Chem Soc. 1991;113:6657 -62.
95. Pinzon CG, Curtidor H, Garcia J, Vanegas M, Vizcaino C, Patarroyo MA, et al. Sequences of the Plasmodium falciparum cytoadherence-linked asexual protein 9 implicated in malaria parasite invasion to erythrocytes. Vaccine. 2010;28(14):2653-63. Epub 2010/01/21.
96. Jiménez MA, Nieto, J.L., Rico, M. Péptidos en Biología y Biomedicina: Determinación estructural de péptidos por RMN. Madrid1997. 157-93 p.
97. Ishino T, Yano K, Chinzei Y, Yuda M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. PLoS Biol. 2004;2(1):E4. Epub 2004/01/23.
98. Wirth CC, Glushakova S, Scheuermayer M, Repnik U, Garg S, Schaack D, et al. Perforin-like protein PPLP2 permeabilizes the red blood cell membrane during egress of Plasmodium falciparum gametocytes. Cell Microbiol. 2014;16(5):709-33. Epub 2014/03/08.
99. Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, et al. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. Cell Host Microbe. 2008;3(2):88-96. Epub 2008/03/04.
100. Hamaoka BY, Ghosh P. Structure of the essential Plasmodium host cell traversal protein SPECT1. PloS one. 2014;9(12):e114685. Epub 2014/12/06.

101. Garg S, Agarwal S, Kumar S, Shams Yazdani S, Chitnis CE, Singh S. Calcium-dependent permeabilization of erythrocytes by a perforin-like protein during egress of malaria parasites. *Nat Commun.* 2013;4:1736.
102. Voet D, J. V. *Bioquímica.* 2006.
103. Salazar LM, Alba MP, Torres MH, Pinto M, Cortes X, Torres L, et al. Protection against experimental malaria associated with AMA-1 peptide analogue structures. *FEBS letters.* 2002;527(1-3):95-100. Epub 2002/09/11.
104. Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current protein & peptide science.* 2000;1(4):349-84. Epub 2002/10/09.
105. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 1983;22(12):2577-637. Epub 1983/12/01.
106. Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Analytical biochemistry.* 2000;287(2):243-51. Epub 2000/12/09.
107. Petsko G, Ringe D. *Protein Structure and Fuction: New Science Press Ltd; 2004.*
108. Hadders MA, Beringer DX, Gros P. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science.* 2007;317(5844):1552-4. Epub 2007/09/18.
109. Tweten RK. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infection and immunity.* 2005;73(10):6199-209. Epub 2005/09/24.
110. Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RH, Buckle AM, et al. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol.* 2008;10(9):1765-74. Epub 2008/06/20.
111. Baran K, Dunstone M, Chia J, Ciccone A, Browne KA, Clarke CJ, et al. The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity.* 2009;30(5):684-95. Epub 2009/05/19.
112. Patarroyo ME, Cifuentes G, Martinez NL, Patarroyo MA. Atomic fidelity of subunit-based chemically-synthesized antimalarial vaccine components. *Progress in biophysics and molecular biology.* 2010;102(1):38-44. Epub 2009/12/08.
113. Patarroyo ME, Cifuentes G, Pirajan C, Moreno-Vranich A, Vanegas M. Atomic evidence that modification of H-bonds established with amino acids critical for host-cell

binding induces sterile immunity against malaria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(3):529-35. Epub 2010/03/09.

114. Patarroyo ME, Alba MP, Reyes C, Rojas-Luna R, Patarroyo MA. The Malaria Parasite's Achilles' Heel: Functionally-relevant Invasion Structures. *Current issues in molecular biology.* 2015;18:11-20. Epub 2015/04/02.

115. Garrett RH, Grisham CM. *Biochemistry.* 2013/2009 Brooks/Cole CL, editor2013.

116. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 1994;368(6468):215-21. Epub 1994/03/17.

117. Karosiene E, Rasmussen M, Blicher T, Lund O, Buus S, Nielsen M. NetMHCIIpan-3.0, a common pan-specific MHC class II prediction method including all three human MHC class II isotypes, HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ. *Immunogenetics.* 2013;65(10):711-24. Epub 2013/08/01.

118. Lund O, Nielsen M, Kesmir C, Petersen AG, Lundegaard C, Worning P, et al. Definition of supertypes for HLA molecules using clustering of specificity matrices. *Immunogenetics.* 2004;55(12):797-810. Epub 2004/02/14.

119. Purmova J, Salazar LM, Espejo F, Torres MH, Cubillos M, Torres E, et al. NMR structure of Plasmodium falciparum malaria peptide correlates with protective immunity. *Biochimica et biophysica acta.* 2002;1571(1):27-33. Epub 2002/05/29.

120. Patarroyo ME, Bermudez A, Alba MP. The high immunogenicity induced by modified sporozoites' malarial peptides depends on their phi (varphi) and psi (psi) angles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;429(1-2):81-6. Epub 2012/11/13.

121. Patarroyo ME, Moreno-Vranich A, Bermudez A. Phi (Phi) and psi (Psi) angles involved in malarial peptide bonds determine sterile protective immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;429(1-2):75-80. Epub 2012/11/13.

122. Siau A, Silvie O, Franetich JF, Yalaoui S, Marinach C, Hannoun L, et al. Temperature shift and host cell contact up-regulate sporozoite expression of Plasmodium falciparum genes involved in hepatocyte infection. *PLoS pathogens.* 2008;4(8):e1000121. Epub 2008/08/09.

123. Engelmann S, Silvie O, Matuschewski K. Disruption of Plasmodium sporozoite transmission by depletion of sporozoite invasion-associated protein 1. *Eukaryot Cell.* 2009;8(4):640-8. Epub 2009/02/03.

124. Arevalo-Pinzon G, Curtidor H, Munoz M, Patarroyo MA, Patarroyo ME. Synthetic peptides from two Pf sporozoite invasion-associated proteins specifically interact with HeLa and HepG2 cells. *Peptides*. 2011;32(9):1902-8. Epub 2011/08/26.
125. Manavalan P, Johnson WC, Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analytical biochemistry*. 1987;167(1):76-85. Epub 1987/11/15.
126. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Inmunología*. Quinta ed2011.
127. Rydzak J, Kaczmarek R, Czerwinski M, Lukaszewicz J, Tyborowska J, Szewczyk B, et al. The baculovirus-expressed binding region of Plasmodium falciparum EBA-140 ligand and its glycophorin C binding specificity. *PloS one*. 2015;10(1):e0115437. Epub 2015/01/15.
128. Rammensee HG, Friede T, Stevanović S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 1995;41(4):178-228. Epub 1995/01/01.
129. Cifuentes G, Espejo F, Vargas LE, Parra C, Vanegas M, Patarroyo ME. Orientating peptide residues and increasing the distance between pockets to enable fitting into MHC-TCR complex determine protection against malaria. *Biochemistry*. 2004;43(21):6545-53. Epub 2004/05/26.
130. Bermudez A, Calderon D, Moreno-Vranich A, Almonacid H, Patarroyo MA, Poloche A, et al. Gauche(+) side-chain orientation as a key factor in the search for an immunogenic peptide mixture leading to a complete fully protective vaccine. *Vaccine*. 2014;32(18):2117-26. Epub 2014/03/04.
131. Dunbrack RL, Jr., Karplus M. Backbone-dependent rotamer library for proteins. Application to side-chain prediction. *Journal of molecular biology*. 1993;230(2):543-74. Epub 1993/03/20.
132. Robinson JH, Delvig AA. Diversity in MHC class II antigen presentation. *Immunology*. 2002;105(3):252-62. Epub 2002/03/29.
133. Cunha-Neto E. MHC-restricted antigen presentation and recognition: constraints on gene, recombinant and peptide vaccines in humans. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1999;32(2):199-205. Epub 1999/05/29.
134. Novotny M, Kleywegt GJ. A survey of left-handed helices in protein structures. *Journal of molecular biology*. 2005;347(2):231-41. Epub 2005/03/03.
135. Horng JC, Raines RT. Stereoelectronic effects on polyproline conformation. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2006;15(1):74-83. Epub 2005/12/24.

12. ANEXOS