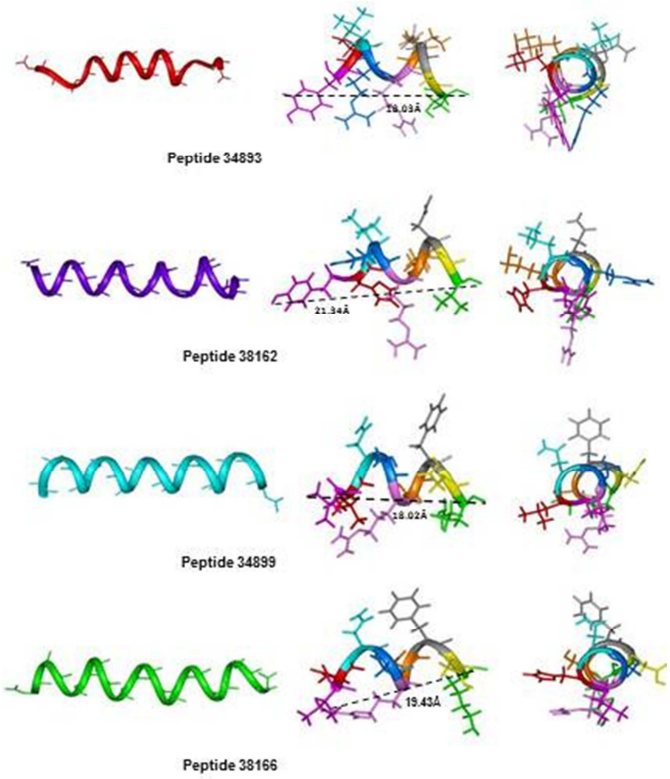
Estudio de las Modificaciones Conformacionales y su Influencia en la Actividad Inmunológica de Péptidos Derivados de las Familias de las Proteínas SPECT-1 y -2, SIAP-1 y -2 de *Plasmodium falciparum*



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

Especialmente quiero dedicar esta meta a mi familia por su comprensión, firmeza, fuerza y el amor que me brindaron en este proceso académico. A mi esposo Fabio por la confianza e impulso que me dio para seguir adelante en algunos momentos de debilidad. A mi hija Daniela, por su apoyo incondicional y el amor que me brinda en cada segundo de mi existencia y por aceptar sin renegar por no tener una mamá de tiempo completo.

Además decirles a mi hija y a mis sobrinos Andrés, Alejandro, Isabela y Santiago que nunca olviden que sus sueños se construyen día a día que no importa la edad hay que luchar por alcanzarlos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme en cada día de mi vida.

Quiero agradecer sinceramente a todas aquellas personas que compartieron sus conocimientos conmigo para hacer posible que esta tesis llegara al final.

A la Universidad del Rosario por haberme aceptado en su programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y por la beca otorgada durante el tiempo de este doctorado.

A la Fundación Instituto de Inmunología donde realicé el trabajo experimental y llevo toda mi vida profesional, bajo la dirección del profesor Manuel Elkin Patarroyo a quien expreso mi más profundo y sincero agradecimiento por todo lo que me ha enseñado.

A mis compañeros y amigos (Nana, Gladys, Hannia, Roció y Jorge) del grupo de Resonancia Magnética Nuclear de FIDIC, por toda su colaboración y por estar siempre ahí apoyándome, dándome ánimo para seguir adelante y no desfallecer durante la culminación de este trabajo.

Al grupo de Síntesis (Dirigido por la Dra. Magnolia Vanegas), Receptor-Ligando (Dirigido por el Dr. Hernando Curtidor), Biología Molecular (Dirigido por el Dr. Manuel A. Patarroyo) y de Inmunoquímica (dirigido por Yolanda Silva y Martha Forero), por su colaboración en los ensayos correspondientes. A los demás compañeros que de alguna manera contribuyeron para que este trabajo se llevara a feliz término.

A la estación de primates de la FIDIC donde se realizó toda la experimentación en los monos *Aotus*.

Al Doctor Hernando Curtidor, a la Msc. Rocio Rojas y al Dr. Fabio Castillo por la lectura de este documento.

A mis padres Martha y Ricardo, a mis hermanos Monica y Jorge por su comprensión, por su amor y por ayudarme a ser lo que soy como persona. Además, por ser un ejemplo a seguir por su dedicación y esfuerzo en todas sus metas propuestas.

A mi esposo Fabio y a mi hija Daniela que es uno de los más grandes tesoros que tengo en mi vida, gracias por todo su apoyo incondicional, amor, comprensión, por ser fuente de inspiración para mí, para seguir adelante cada día y alcanzar esta meta y otras más….Muchas gracias los AMO.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN ***15***

SUMMARY ***15***

1. INTRODUCCIÓN ***17***

2. HIPOTESIS ***20***

3. OBJETIVOS ***20***

3.1. Objetivos Generales **20**

3.2. Objetivos Específicos **20**

4. ESTADO DEL CONOCIMIENTO ***23***

4.1. La malaria **23**

4.2. *Plasmodium falciparum* **26**

4.2.1. El ciclo de vida del *Plasmodium falciparum* 27

4.2.2. Estadios invasivos de *P. falciparum* en el hospedero humano 28

4.2.3. Proteínas del estadio pre-eritrocítico o exo-eritrocítico 33

4.2.3.1. Inmunidad protectiva en el estadio pre-eritrocítico……..34

4.3. Síntesis química de péptidos en fase sólida. Principios generales **35**

4.4. Interacción Receptor Ligando **36**

4.5. Dicroísmo Circular (DC) **37**

4.6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Principios generales **38**

4.7. Calculo de Estructura Molecular **47**

4.8. Técnicas Inmunoquímicas **49**

5. METODOLOGÍA ***53***

5.1. Síntesis de péptidos en fase sólida **53**

5.2. Oxidación para la polimerización de los péptidos **54**

5.3. Purificación de los péptidos por cromatografía liquida de alta eficiencia en fase reversa (CLAE-FR) semipreparativa **55**

5.4. Caracterización de los péptidos **55**

5.4.1. Determinación de la pureza de los péptidos por CLAE-FR analítica 55

5.4.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF 56

5.5. Dicroísmo Circular (DC) **56**

5.6. Ensayos de receptor-ligando **56**

5.6.1. Radio-marcaje de los péptidos con ^{125}I 56

5.6.2. Ensayos de unión a células HeLa 57

5.6.3. Determinación de las constantes de afinidad 57

5.6.4. Ensayos de unión con tratamiento enzimático de células HeLa 57

5.7. Estudios de inmunogénicidad de los péptidos **58**

5.7.1 Animales e Inmunización 58

5.7.2. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) 58

5.7.3. Western blot 59

5.7.4. Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas – ELISA 60

5.8. Obtención del Modelo Tridimensional de los Péptidos 60
5.8.1. Resonancia Magnética Nuclear (^{1}H-RMN) 60
5.8.2. Cálculo de la estructura molecular 61

6. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL E INMUNOGENICIDAD DE PÉPTIDOS (cHABPS Y mHABPS), DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS SPECT 1 Y 2, BÚSQUEDA DE LA RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA 3D Y SU ACTIVIDAD INMUNOLÓGICA ..... .63

6.1. Introducción 63

6.2. Proteína de Micronema del Esporozoíto Esencial para el Paso a Través de las Células 1 y 2 (Sporozoite microneme Protein Essential for Cell Traversal-1 and 2 -SPECT-1 y -2) 63

6.3. Resultados y Discusión 66
6.3.1. Síntesis, purificación, caracterización y ensayos de unión de los péptidos de las proteínas SPECT-1 y 2 a células HeLa 66
6.3.1.1. Proteína SPECT-1 66
6.3.1.2. Proteína SPECT-2 68
6.3.2. Localización de SPECT-1 y -2 70
6.3.3. Diseño de péptidos modificados 71
6.3.4. Determinación de la Estructura Tridimensional 72
6.3.4.1. Proteína SPECT-1 73
6.3.4.2. Proteína SPECT-2 85
6.3.5. Estudios Estructurales 94
6.3.6. Estudios inmunológicos y Relación estructura-función 100

6.4. Conclusiones 104

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 107

7.1. Introducción 107

7.2. Proteínas Asociadas con la Invasión del Esporozoíto -1 y 2 (Sporozoite Invasion-Associated Proteins -1 and -2 -SIAP-1 y -2) 108

7.3. Resultados y Discusión 110
7.3.1. Síntesis, purificación y caracterización de los péptidos 110
7.3.2. Diseño de péptidos modificados 111
7.3.3. Determinación de la Estructura Tridimensional 112
7.3.3.1. Proteínas SIAP-1 y -2 113
7.3.4. Estudios Inmunológicos 120
7.3.5. Relación estructura-función 122

7.4. Conclusiones 127

8. CONCLUSIONES GENERALES 129

9. PERSPECTIVAS 131

10. ARTÍCULOS COMPLEMENTARIOS 132

11. BIBLIOGRAFÍA 135

12. ANEXOS 146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución global de la malaria 24
Figura 2. Ciclo de vida del *Plasmodium* 28
Figura 3. Características estructurales del esporozoíto y ubicación de algunas de sus proteínas 30
Figura 4. Características estructurales del merozoíto 31
Figura 5. Ubicación de algunas de las proteínas del merozoíto 32
Figura 6. Componentes del haz de luz polarizada y Espectros de DC de poli-péptidos mostrando diferentes estructuras secundarias 38
Figura 7. Ejemplo de espectro de resonancia magnética nuclear unidimensional y bidimensional de un péptido 41
Figura 8. Esquema de la secuencia de pulsos de un experimento en 2D de resonancia magnética nuclear 41
Figura 9. Esquema de la secuencia de pulsos del COSY 42
Figura 10. Interacciones a 3 enlaces de un aminoácido en un espectro COSY 43
Figura 11. Sistema de espín para un aminoácido en un espectro TOCSY 44
Figura 12. Esquema de la secuencia de pulsos del TOCSY 44
Figura 13. Esquema de la secuencia de pulsos del NOESY 45
Figura 14. Interacciones NOE 45
Figura 15. Patrones de conectividades para las diferentes estructuras secundarias 46
Figura 16. Interacciones de Hidrógenos obtenidos por los diferentes experimentos 2D 46
Figura 17. Síntesis de péptidos en fase Solida estrategia t-Boc/Bcl 54
Figura 18. Esquema del ensayo de inmunización 59
Figura 19. Representación esquemática de SPECT-1 y -2 64
Figure 20. Caracterización del péptido 33375 67
Figura 21. Espectro de DC de los cHABPs 33372, 33374 y 33375 73
Figura 22. Espectro TOCSY del cHABP 33375 75
Figura 23. Región del espectro TOCSY en la que se distingue el sistema de espín para Val y Tyr 76
Figura 24. Espectro NOESY región de interacción entre HN y Hα del cHABP 33375 78
Figura 25. Diagrama de conectividades del cHABP 33375 79
Figura 26. Parte del archivo .rstrnt del péptido 33375 80
Figura 27. Modelo de conformación extendida del péptido 33375 81
Figura 28. Familia de estructuras del péptido 33375 81

Figura 29. Espectros de DC de los péptidos modificados **38150** y **38152** 82
Figura 30. Diagrama de conectividades del mHABP **38152** 84
Figura 31. Familia de conformeros para el mHABP **38152** 85
Figura 32. Diagrama de conectividades para los cHABPs derivados de SPECT-2 88
Figura 33. Familia de estructuras seleccionadas para los cHABPs 34936, 34941, 34949 y 34951 90
Figura 34. Espectros de DC de los péptidos modificados derivados del 34935, 34936, 34938, 34941,34949 y 34951 de SPECT-2 92
Figura 35. Diagrama de conectividades para **38092** y **38094** 93
Figura 36. Familia de conformeros seleccionados para **38092** y **38094** 94
Figura 37. Superposición del péptido 33375 sobre la estructura 3D de SPECT-1 95
Figura 38. Estructura 3D del dominio MACPF mostrando la ubicación de los cHABPs derivados del SPECT-2 97
Figura 39. Representación esquemática de SIAP-1 y -2 108
Figure 40. Caracterización del péptido conservado purificado 34893 111
Figura 41. Espectros de DC de los cHABPs 34874, 34893, 34898 y 34899 de SIAP-1 y 36879 de SIAP-2 113
Figura 42. Diagrama de conectividades para 34874, 34893, 34898 y 34899 derivados SIAP-1 115
Figura 43. Familia de estructuras seleccionadas para 34874, 34893, 34898 y 34899 116
Figura 44. Espectros de DC de los mHABPs **38162** y **38166** (SIAP-1), **38154**, **38156**, **38884** y **38886** (SIAP-2) 117
Figura 45. Resumen de conectividades secuenciales y de medio rango para **38162** y **38166** 118
Figura 46. Familia de confórmeros escogidos para **38162** y **38166** 119
Figura 47. Inmunofluorescencia de los mHABPs **38162** (SIAP-1) y **38156** (SIAP-2) 121

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia y ubicación de los cHABPs pertenecientes a SPECT-2 69

Tabla 2. Secuencia de posibles epitopes B para SPECT-1 y -2 70

Tabla 3. Secuencias de mHABPs pertenecientes a SPECT-1 71

Tabla 4. Secuencias de mHABPs pertenecientes a SPECT-2 72

Tabla 5. Desplazamiento químico para el cHABP 33375 77

Tabla 6. Desplazamiento químico para el péptido **38152** 83

Tabla 7. Resumen de estructura para los péptidos de SPECT-1 85

Tabla 8. Resultado del cálculo de estructura para los cHABPs derivados de SPECT-2 89

Tabla 9. Resultados de dicroísmo circular para péptidos modificados derivados de cHABPs de SPECT-2 91

Tabla 10. Resultados del cálculo de estructura para los mHABPs **38092** y **38094** 94

Tabla 11. Secuencias, títulos de anticuerpos obtenidos por IFI y estructura obtenida por DC o por ^{1}H-RMN del cHABP 33375 y sus mHABPs **38150** y **38152** 101

Tabla 12. Secuencias, registros y motivos de unión para el cHABP 33375 y su mHABP **38152**, obtenidos por NetMHCIIpan 3.0 Server 102

Tabla 13. Secuencias, anticuerpos obtenidos por IFI y estructura obtenida por ^{1}H-RMN y cálculo de estructura del cHABP 34941 y sus mHABPs **38092** y **38094** 103

Tabla 14. Secuencias, títulos de anticuerpos obtenidos por IFI y estructura obtenida por DC o por ^{1}H-RMN de los cHABPs 34938 y 34949 y sus mHABPs 104

Tabla 15. Secuencias de los péptidos conservados de alta unión sintetizados, caracterizados y purificados de SIAP 1 y 2 111

Tabla 16. Secuencias de los cHABPs y sus correspondientes mHABPs provenientes de las proteínas SIAP-1 y SIAP-2 112

Tabla 17. Tabla de desplazamiento químico del cHABP 34893 derivado de SIAP-1 114

Tabla 18. Resultados del cálculo de estructura para 34874, 34893, 34898 y 34899 116

Tabla 19. Resultado del cálculo de estructura para los mHABPs **38162** y **38166** derivados de SIAP-1 119

Tabla 20. Registro de unión para 34893 y **38162** cuando ajustan en HLA-DRβ1*0802 124

Tabla 21. Registro de unión para 34899 y **38166** cuando ajustan en HLA-DRβ1*0302 125

Tabla 22. Valor del ángulo $\chi 1$ para los péptidos modificados **38162** y **38166** 126

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. 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. 32:154-60

Anexo 2. Región de interacción *HNi - HNi+1*

Anexo 3. Protocolo “Simulated Annealing”

Anexo 4. Alineamiento del dominio MACPF de la proteína SPECT-2 y el dominio MACPF del factor de complemento C8α.

Anexo 5. Alba MP, Suarez CF, Varela Y, Patarroyo MA, Bermudez A, Patarroyo ME. TCR-contacting residues orientation and HLA-DRβ* binding preference determine long-lasting protective immunity against malaria. BBRC. 2016. 477:654-670

Anexo 6. 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 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: 349-55.

Anexo 8. Patarroyo ME, Alba MP, Curtidor H, Vanegas M, Almonacid H, Patarroyo MA. Using the *Pf*EMP1 head structure binding motif to deal a blow at severe malaria. PLoS One. 2014. 9:e88420.

Anexo 9. 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 10. 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.

LISTA DE ABREVIATURAS

A, Ala	Alanina
Ac	Anticuerpo
ACF	Adyuvante Completo de Freund
Ag	Antígeno
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
BCIP	p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
C, Cys	Cisteina
CAC	Condroitinasa AC
CABC	Condroitinasa ABC
CH_3CN	Acetonitrilo (ACN)
CLAE-FR	Cromatografía Liquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa
CMH II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II
COSY	(COrrelated SpectroscopY) Espectroscopia de correlación
Cross Peak	Señal de correlación en espectros 2D
D, Asp	Ácido Aspártico
$d\alpha N$	Distancia del H del carbono α al H del nitrógeno amídico
$d\beta N$	Distancia del H del carbono β al H del nitrógeno amídico
dNN	Distancia del H amídico del residuo i al H del nitrógeno amídico del residuo i+2
$d\alpha\beta$	Distancia del H del carbono α al H del carbono β
δ	Desplazamiento químico en partes por millón (ppm)
DC	Dicroísmo Circular
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DG	“Distance Geometry” programa de distancia geométrica
DMSO	Dimetilsulfoxido
E, Glu	Ácido Glutámico
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción asociado a enzimas
F, Phe	Fenilalanina
FID	“Free Induction Decay” Señal de decaimiento libre
FIDIC	Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
G, Gly	Glicina

H, His	Histidina
HBS	Buffer salino
^{1}H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HeLa	Células de cáncer cérvico-uterino (Obtenidas de Henrietta Lacks)
HepG2	Línea celular de hepatoma humano
HF	Ácido fluorhídrico
HI	Heparinasa I
HII	Heparinasa II
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
I, Ile	Isoleucina
IFI	InmunoFluorescencia Indirecta
K, Lys	Lisina
L, Leu	Leucina
M, Met	Metionina
MALDI-TOF	“Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight”
MBHA	Clorhidrato de p-metilbencilhidrilamina
N, Asn	Asparagina
NOESY	(Nuclear Overhauser Effect) espectroscopía de efecto nuclear amplificado
NOE	Señal del espectro NOESY
NBT	Cloruro de tetrazolio nitro-azul (Nitroblue Tetrazolium)
P, Pro	Prolina
PBS	Buffer fosfato salino
PDB	“Protein Data Bank” Banco de datos de proteínas
Phi	ϕ ángulo phi
P.M.	Peso molecular
Psi	ψ ángulo psi
Q, Gln	Glutamina
R, Arg	Arginina
Random Coil	Estructura desordenada o sin estructura definida
RLT	Receptor de Linfocitos T
rMD	Dinámica Molecular Restringida

RMSD	“Root Mean Square Deviation” Desviación cuadrática media ó desviación de la raíz cuadrada de las medias
S, Ser	Serina
SA	“Simulated Annealing”
T, Thr	Treonina
t-Boc	ter-butiloxicarbonil
TBS	Tris-buffer salino
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	Ácido 2,2,2-trifluoroetanol
TFE-d3	Ácido 2,2,2-trifluoroetanol deuterado
TOCSY	(TOtal Correlated SpectroscopY) espectroscopia de correlación total
V, Val	Valina
Y, Tyr	Tirosina
W, Trp	Triptófano

RESUMEN

SPECT-1 y -2 y SIAP-1 y -2 son proteínas pertenecientes al esporozoíto de *Plasmodium falciparum* causante de la malaria más agresiva en los humanos. Estas proteínas están involucradas en el paso del parásito a través de las células del hospedero humano y en la invasión del hepatocito, haciéndolas blancos atractivos para ser estudiadas. Péptidos conservados de alta capacidad de unión (cHABPs) a células HeLa y HepG2 derivados de estas moléculas son no inmunogénicos porque son incapaces de generar una respuesta inmunitaria, pero son claves para el parásito porque cumplen una función importante durante la infección del hospedero humano. En este trabajo se encontró que algunos cHABPs 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 través de las células del hospedero.

Por otro lado, con el fin de cambiar el comportamiento inmunológico de cHABPs derivados de SPECT-1 y -2 y SIAP-1 y -2, se obtuvieron nuevos péptidos mediante el reemplazo de aminoácidos críticos por otros residuos cuya masa molecular sea similar, pero diferente en su polaridad. En este trabajo se reporta que dichas modificaciones promovieron cambios en la estructura secundaria (determinada por DC o ^{1}H-RMN) de los péptidos modificados (mHABPs) cuando se comparó con la estructura de los cHABPs nativos; adicionalmente, estos mHABPs invirtieron su comportamiento inmunológico convirtiéndose en péptidos inmunogénicos inductores de anticuerpos. Lo que permite establecer la existencia de una relación entre la estructura que adoptan estos mHABPs con su actividad inmunológica.

Además, algunos de los mHABPs estudiados aquí, pueden ser candidatos a ser incluidos en la vacuna contra la malaria químicamente sintetizada multi-epitope y multi-estadio que se está desarrollando en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

Summary

SPECT-1 and -2 and SIAP-1 and -2 are *Plasmodium falciparum* sporozoite proteins causing the most aggressive form of malaria in humans. These proteins are involved in the parasite's human host cell traversal and the invasion of hepatocytes, making them attractive targets for study. Conserved peptides having high binding (cHABPs) affinity for HeLa and HepG2 cells derived from these molecules are not immunogenic because they cannot induce an immune response but are key for the parasite to play a significant role during the infection of a human host.

The present work reports the finding that some SPECT-1 and -2 protein cHABPs are possibly involved in binding and pore formation on host cell membrane, thereby helping sporozoites regarding host cell traversal.

New peptides were obtained by replacing critical amino acids by other residues having similar molecular mass but different polarity aimed at changing SPECT-1 and -2 and SIAP-1 and -2 derived-cHABPs' immunological behaviour. CD or ^{1}H-NMR determined that such modifications promoted changes in modified peptide (mHABP) secondary structure compared to that of native cHABPs. These mHABPs' immunological behaviour also became inverted, making them become antibody-inducing, immunogenic peptides. FIDIC's search for a multi-stage, multi-epitope, chemically-synthesised anti-malarial vaccine has led to establishing a relationship between mHABP structure and their immunological activity, meaning that some mHABPs studied here could be candidates for such vaccine.

1. INTRODUCCIÓN

La situación mundial con respecto a la malaria muestra que cerca de 300 millones de personas desarrollan la enfermedad y aproximadamente 700 mil de ellas mueren cada año (1). Este panorama empeora rápidamente como consecuencia de la ausencia de nuevas alternativas terapéuticas, del desarrollo de resistencia por parte del *Plasmodium* a los medicamentos existentes en las áreas donde la malaria es frecuentemente trasmitida, la resistencia del mosquito vector a los insecticidas, de las condiciones socioeconómicas de las poblaciones en riesgo, del cambio climático y la falta de una vacuna eficaz contra esta enfermedad (1, 2).

Esta situación ha estimulado la búsqueda de diferentes opciones para el control de la enfermedad, como por ejemplo, la investigación del desarrollo de medicamentos antimaláricos más eficaces y una de las alternativas más prometedoras es el desarrollo de una vacuna que incluya diferentes proteínas (multi-antígeno ó multi-epitope) derivadas de los distintos estadios del parásito (multi-estadio) (3, 4), podría ser una estrategia conveniente para prevenir y controlar la enfermedad.

Por consiguiente, la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) viene trabajando desde hace algunos años en el desarrollo de una metodología lógica y racional para la obtención de una vacuna sintética multi-estadio, multi-epitope y completamente eficaz contra la malaria. Teniendo claro que las vacunas sintéticas basadas en péptidos son específicas, ya que una vez ubicados los epítopes responsables de la repuesta inmunitaria, estos pueden ser incluidos en el diseño de las vacunas, las cuales son más seguras que las basadas en microorganismos y más estables a temperatura ambiente (5).

En el desarrollo de esta metodología, en la FIDIC se ha implementado un método que permite identificar regiones conservadas de proteínas involucradas en los procesos de invasión. La generación de anticuerpos contra estas regiones conservadas permite el bloqueo de la interacción receptor-ligando entre el merozoíto y el glóbulo rojo, entre el esporozoíto y células HepG2 y HeLa inhibiendo de esta manera la entrada del parásito a la célula. Gracias a esto se han identificado péptidos conservados (sin variabilidad genética) con alta capacidad de unión (Conserved High Activity Binding Peptides - cHABPs) a glóbulos rojos (6), a células HepG2 y a células HeLa (7, 8). Asimismo, se han

identificado los residuos o aminoácidos críticos en la unión de estos péptidos a las células blanco, los cuales como se menciona más adelante deben ser reemplazados.

En ensayos inmunológicos, estos péptidos conservados o nativos (cHABPs) demostraron ser no inmunogénicos, ni protectivos contra la malaria en el modelo del mono *Aotus* (3, 8). Para cambiar este comportamiento inmunológico, la estrategia consiste en modificar las propiedades químicas de estos péptidos reemplazando los aminoácidos críticos para la unión por otros aminoácidos cuya cadena lateral sea similar en masa molecular, pero diferente en cuanto a polaridad (péptidos modificados, mHABPs) así, algunos de estos cambios son: F—R; W—Y; L—H; P—D; M—K; C—T o V; Q—E, A—S (3, 9, 10).

Adicionalmente, teniendo en cuenta que en estudios previos se ha observado la importancia de las modificaciones estructurales sobre los péptidos conservados para inducir protección, el conocimiento de la estructura 3D de esos antígenos es esencial para contribuir al entendimiento de mecanismos de protección. Entonces, en la búsqueda de una asociación entre la actividad inmunológica y la estructura tanto de los péptidos nativos como de los péptidos modificados, en la FIDIC se ha determinado la estructura 3D de dichos péptidos mediante la técnica de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^{1}H-RMN) y cálculo de estructura (11-14).

Por otra parte, se sabe que la etapa pre-eritrocítica (esporozoíto) del parásito que es la menos estudiada, es clínicamente silenciosa pero fundamental en el establecimiento de la infección en el hospedero mamífero (15), sabiendo que es la primera etapa de la infección por *Plasmodium* debe ser la primera en ser bloqueada por un tratamiento efectivo y el primer blanco potencial de una vacuna eficaz que inhiba la invasión y bloquee el desarrollo de la enfermedad.

Con en el fin de contribuir al conocimiento de la etapa pre-eritrocítica y a la búsqueda de péptidos que puedan ser incluidos en la vacuna que se desarrolla en la FIDIC, en este trabajo se estudiaron las proteínas del micronema del esporozoíto esencial para el paso a través de las células -1 y -2 (*Sporozoite Microneme Protein Essential for Cell Traversal-1 and -2 -SPECT-1 y -2*) y las Proteínas Asociadas con Invasión del Esporozoíto -1 y -2 (Sporozoite Invasion-Associated Proteins -1 and -2 -SIAP-1 y -2) pertenecientes a este estadio, las cuales están involucradas en el proceso de movilidad del parásito desde las

células de la piel del hospedero humano hasta las células hepáticas, y en el proceso de invasión del esporozoíto al hepatocito (16). Se realizó la caracterización estructural de algunos de los péptidos conservados de alta capacidad de unión de las proteínas SPECT-1 y -2, SIAP-1 y -2, y de alguno(s) de sus péptidos modificados estratégicamente que indujeron inmunogenicidad. Se encontraron cambios en la estructura tridimensional de los péptidos modificados inmunogénicos con respecto a los péptidos conservados (no inmunogénicos), lo que permitió indirectamente encontrar una relación entre la estructura 3D de dichos péptidos con su actividad inmunológica; adicionalmente, se encontró que algunos cHABPs pertenecientes a SPECT-1 y -2 están localizados en regiones importantes de las proteínas necesarias para cumplir su función como la formación de poros sobre la membrana de la célula hospedera, lo anterior sugiere que alguno de ellos pueden ser posibles candidatos a ser incluidos en la vacuna contra la malaria que se viene desarrollando en nuestro instituto.

2. HIPOTESIS

La actividad inmunológica de péptidos modificados racionalmente a partir de péptidos conservados derivados de las proteínas SPECT-1 y -2 y SIAP-1 y 2 de *Plasmodium falciparum* con alta capacidad de unión a sus células blanco, está relacionada con cambios en la estructura 3D de dichos péptidos con respecto al péptido conservado o nativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Generales

Determinar la estructura tridimensional e inmunogenicidad de péptidos (cHABPs y sus modificados), derivados de las proteínas SPECT-1 y -2 y SIAP-1 y -2 con el fin de encontrar una relación entre la estructura 3D y su actividad inmunológica; y así establecer si pueden ser incluidos en una vacuna contra la malaria causada por *Plasmodium falciparum*.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar, purificar y caracterizar péptidos nativos derivados de las proteínas SPECT-1 y-2 y de SIAP-1 y-2

- Identificar los péptidos conservados de alta capacidad de unión (no inmunogénicos) a células HeLa

- Diseñar, sintetizar, purificar y caracterizar péptidos modificados de las proteínas SPECT-1 y-2 y de SIAP-1 y-2

- Evaluar la inmunogenicidad de los péptidos modificados

- Determinar la estructura de los péptidos conservados (nativos) y sus modificados.

- Obtener los modelos tridimensionales de los péptidos nativos y modificados.

- Analizar la relación de la estructura 3D de los péptidos estudiados con su inmunogenicidad (relación estructura-función).

4. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

4. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

En esta sección se incluye una vista general de temas y conceptos fundamentales en el desarrollo de este trabajo.

4.1. La malaria

Las enfermedades parasitarias como la malaria siguen siendo un problema de salud a nivel mundial, especialmente en las regiones más pobres del planeta como lo corroboran los datos recopilados en 2014 en el informe anual que entrega la Organización Mundial de la Salud (OMS) acerca de la mortalidad y morbilidad asociada con ella. En este reporte la malaria es catalogada como una enfermedad endémica en 97 países alrededor del mundo (Figura 1); adicionalmente, reportan que cerca de 3000 millones de personas viven en riesgo de adquirirla; además que se presentan aproximadamente 283 millones de casos clínicos y 755 mil muertes anualmente (1).

La malaria es una enfermedad aguda causada por protozoarios del género *Plasmodium*. Las especies de *Plasmodium* clásicamente reconocidas como causantes de malaria humana son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae, P. ovale* y *P. knowlesi* (17); siendo *P. falciparum* la especie causante de las principales complicaciones de la malaria (18), entre las que se encuentran la malaria cerebral, insuficiencia renal, anemia severa, síndrome de dificultad respiratoria aguda, ictericia y daño hepático, hemorragias, hiperparasitemia, hipoglicemia grave, síntomas gastrointestinales y la muerte, por tanto es la de mayor impacto en la salud humana (2, 19, 20).

La malaria producida por *P. falciparum* se reporta en países ubicados en regiones tropicales como los localizados en África subsahariana (Tanzania, Gambia, Ghana, Guinea, Burkina Faso, entre otros), los del sudeste de Asia (India, Indonesia, Pakistán, etc.); en Sur América países que abarcan una parte de la selva amazónica (Colombia, Brasil y Perú), Surinam y Guyana Francesa; respecto a *P. vivax se encuentra* en Asia (Corea del Norte y del Sur, Iraq, India, Sri Lanka, entre otros), en América del Sur (Colombia, Brasil, Bolivia, Ecuador, Perú y Venezuela, etc.), *P. knowlesi se presenta* en Malasia, Tailandia y Taiwán, y la malaria producida por *P. malariae* y *P.*

ovale se reportan en un bajo porcentaje en algunos países de África (Camerún y Liberia) (21).

La prevalencia habitual de la malaria en zonas endémicas contribuye a que algunos grupos poblacionales sean los más afectados, que desarrollan malaria severa o incluso que mueran. Por ejemplo, en zonas hiperendémicas entre un 51 y 75% de niños entre 2 y 10 años presentan malaria, en zonas holoendémicas un porcentaje mayor al 75% de niños de un año de edad tienen la enfermedad; esto sucede en África subsahariana (Figura 1) la zona que sufre las consecuencias de manera más desproporcionada, con aproximadamente un 80% de todos los casos y hasta un 90% de todas las muertes; siendo los niños pequeños y las mujeres embarazadas los grupos poblacionales más vulnerables, en esta zona el 77% de las muertes reportadas son atribuidas a menores de cinco años (17, 22). En zonas de menor endemicidad, como América Latina y Asia, todos los grupos etarios se afectan y la forma complicada o grave de la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en hombres jóvenes y mujeres embarazadas (23).

Figura 1. Distribución global de la malaria, en verde se observan las zonas que no son afectadas por la enfermedad y en amarillo las regiones donde se presenta la malaria (Tomado de http://malaria-plasmodium.blogspot.com).

La OMS estima que en América el número de casos supera el millón, de los cuales el 35% corresponde a infección por *Plasmodium falciparum*, la mortalidad en el continente se estima en 1.100 casos (1). En la región de las Américas el 30% de la población de 21

países se encuentra en riesgo, Brasil y Colombia son los países con el mayor número de casos anuales aportando el 68% de los casos de la región (24).

En Colombia, al igual que a nivel mundial, la malaria representa un problema prioritario en salud pública. Las migraciones masivas, como resultado de la violencia o de la situación económica, la falta de acceso de gran parte de la población a los servicios de salud, factores ambientales como el deterioro del ecosistema y los desastres naturales, así como las condiciones inadecuadas de vivienda de las áreas rurales, han contribuido al incremento de la prevalencia de malaria en las últimas décadas (24, 25). En Colombia, aproximadamente 12 millones de personas habitan en zonas de riesgo de transmisión de esta enfermedad. Si bien la mortalidad por malaria ha disminuido, la morbilidad por esta enfermedad se mantiene elevada. En nuestro país en general hay un predominio de malaria por *P. vivax*, al que en promedio se le asignan el 68.6% de los casos, mientras que a *P. falciparum* le corresponden el 30,1% (aunque esta proporción se invierte en la Costa Pacífica); sin embargo, en 2014 los casos de malaria causada por *P. vivax* y *P. falciparum* fueron similares; para *P. vivax* se reportó el 49.6% de los casos y para *P. falciparum* el 48.8%, también se reportó el 1.41% de malaria mixta (*P. vivax* y *P. falciparum*) y 0.02% por *P. malariae.* Los departamentos más afectados son Choco (42,4% de casos), Antioquia (24,5%), Nariño (12,6%), Bolívar (4,5%), Córdoba (3,8%) y Amazonas (2,8%), entre otros (26). Como se mencionó anteriormente, en Colombia ha disminuido la morbilidad causada por malaria gracias a las políticas implementadas a nivel de vigilancia, prevención y control de esta enfermedad en todas las regiones del país, con especial énfasis en aquellas donde predomina la malaria, lo que ha permitido el fortalecimiento en el acceso al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, el establecimiento de estrategias preventivas en dichas zonas y el diagnóstico oportuno de los casos (24, 27).

Aunque en Colombia y en el resto del mundo, gracias a las políticas de prevención, de diagnóstico y de vigilancia, se han tenido grandes avances en el control de esta enfermedad, lo que se ve reflejado en la disminución de la tasa de mortalidad y morbilidad. A pesar de esto, la situación sigue siendo abrumadora debido a la propagación y el aumento la resistencia del parásito, a la mayoría de los medicamentos (por ejemplo, cloroquina, sulfadoxina-piretamina y artemisina) y tratamientos antimaláricos existentes, desarrollo de la resistencia del vector (el mosquito *Anopheles)* a los insecticidas comúnmente usados y el desplazamiento de poblaciones a áreas endémicas (18).

Esta situación ha estimulado y obligado a la búsqueda de diferentes opciones para el control de la enfermedad, entre las que se encuentran la búsqueda de nuevos medicamentos antimaláricos más eficaces, tratamientos de terapia combinada y el desarrollo de vacunas, lo que se consigue solamente adquiriendo una profunda comprensión de la biología del parásito, lo que conllevará a la identificación de nuevos blancos terapéuticos que den lugar a estrategias bien establecidas para el control de la enfermedad.

4.2. *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum es un protozoo perteneciente al filum Apicomplexa (Clase Sporozoea) que incluye otros patógenos importantes como: *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* y *Babesia* entre otros.

Los miembros de este filum son todos parásitos de localización intracelular, los cuales en su morfología carecen de órganos de locomoción (cilios o flagelos), excepto los microgametos. Presentan una fase de reproducción asexual y otra sexual, por lo que pueden estar como merozoítos, gametos, esporozoítos o como zigoto y en cada uno de estos estadios presenta una morfología diferente (28-30), con características bioquímicas, funcionales e inmunológicas distintas.

Al igual que otros miembros del filum, los estadios extracelulares o estadios invasivos del *Plasmodium* son el oocisto, el esporozoíto y el merozoíto (también llamados zoitos) (31). La invasión de los zoitos a la célula hospedera implica varios pasos: a) contacto, b) unión a los receptores de la superficie de la célula por medio de la reorientación del polo apical, c) liberación del contenido de los organelos apicales, d) por último, la invaginación y la formación de la vacuola parasitófora donde el parásito vive y se replica en el interior de la célula huésped (29).

Los *Plasmodium* son transmitidos al humano por mosquitos hembras del género Anopheles, que estando infectados, al picar, inoculan los esporozoítos, forma infectante del parásito. La transmisión también puede ocasionalmente ocurrir por inoculación directa de glóbulos rojos infectados por transfusión, como transmisión vertical de una madre infectada al feto y en forma casual por pinchazos con jeringas contaminadas (27).

4.2.1. El ciclo de vida del *Plasmodium falciparum*

Los parásitos del género *Plasmodium* se desarrollan en dos huéspedes y en cada uno de ellos tiene un ciclo reproductivo diferente. En el *Anopheles*, huésped definitivo, se cumple una fase sexual o esporogónica del ciclo de vida del parásito, mientras que en el humano, hospedero intermediario, tiene lugar la fase asexual o esquizogónica (Figura 2).

La fase sexual se inicia en el momento en que, como consecuencia de la necesidad que tienen las hembras *Anopheles* de ingerir sangre, los gametocitos hembra y macho desarrollados en el individuo infectado llegan al estómago del mosquito. El microgameto o gameto macho se fracciona en seis o siete cuerpos flagelares, mientras que el macrogameto o gameto hembra aumenta de tamaño y su núcleo emigra a la periferia en donde sobresale como una estructura cónica sobre la que se implanta uno de los flagelos en el momento de la fecundación (32).

De esto surge el cigoto que se alarga en forma de huso, haciéndose móvil y transformándose en el ooquineto. Este penetra las paredes del intestino medio del mosquito y produce una membrana a su alrededor para formar un ooquiste u oocito, que crece hasta alcanzar la pared externa del estómago del *Anopheles* y se subdivide innumerables veces. En este momento el oocito mide 50 µm y contiene miles de esporozoítos, cuerpos fusiformes con un núcleo central y 13 micras de largo por 2 de diámetro, que por ruptura del oocito maduro son liberados y emigran hacia las glándulas salivares del mosquito en donde sobreviven (32).

Cuando la hembra del *Anopheles* infectada pica al hospedero vertebrado inyecta esporozoítos que pasan al torrente circulatorio del huésped, en donde permanecen aproximadamente 30 minutos. A continuación, invaden las células parenquimatosas del hígado, las únicas adecuadas para su nutrición y desarrollo, en ellas crecen e inician el ciclo esquizogónico (también llamado ciclo pre-eritrocítico), mediante el cual cada esporozoíto se divide consecutivamente hasta dar origen de 15.000 a 45.000 nuevas formas del parásito, que al quedar libres se denominan merozoítos exo-eritrocíticos, capaces de infectar los hepatocitos vecinos e iniciar una nueva generación (32).

Catorce días después de iniciado este ciclo pre-eritrocítico los merozoítos invaden glóbulos rojos, en donde crecen y se reproducen también por esquizogonia (ciclo

eritrocítico), dividiéndose consecutivamente hasta dar origen a merozoítos intra-eritrocíticos que forman el esquizonte adulto eritrocítico. Cuando este se encuentra maduro, se rompe y estalla el eritrocito dejando en libertad nuevos merozoítos, capaces de invadir otros glóbulos rojos e iniciar una nueva generación cada 48 a 72 horas. Después de varias generaciones de esquizogonia eritrocítica, algunos merozoítos no evolucionan a esquizontes sino que conservan un núcleo único, se redondean y alargan, dando lugar a los gametocitos, formas sexuales del protozoario. Estos gametocitos son el macho (microgametocito) y la hembra (macrogametocito), son capaces de vivir 120 días (lo mismo que los glóbulos rojos que los albergan) y son las formas que ingiere el mosquito al picar e iniciar así nuevamente el ciclo sexual (32, 33).

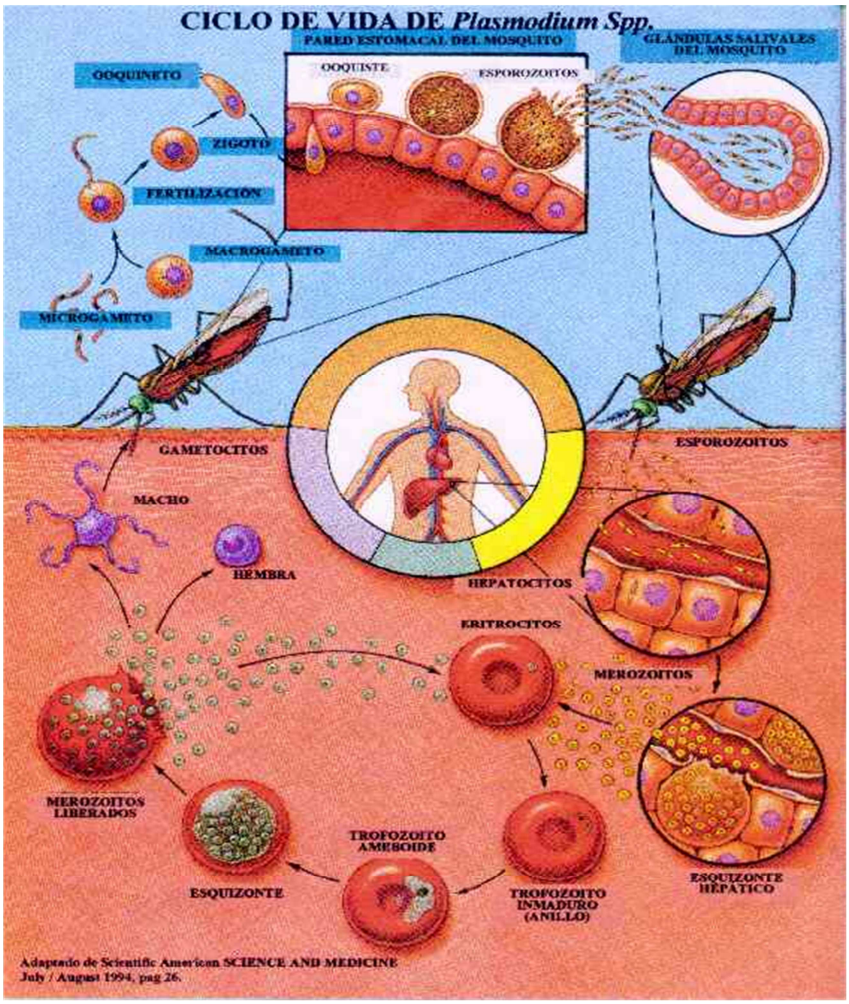


Figura 2. Ciclo de vida del *Plasmodium falciparum*

En este complejo ciclo del *Plasmodium* han sido identificados tres potenciales blancos para el desarrollo de vacunas: a) el estadio pre-eritrocítico (forma invasiva esporozoíto),

cuyo bloqueo evitaría la invasión del parásito y desarrollo en las células hepáticas; b) el estadio eritrocítico (forma invasiva merozoíto) donde se impediría la invasión del parásito, su desarrollo y multiplicación dentro del glóbulo rojo y protegería a la persona contra los síntomas clínicos y c) el intestino del mosquito donde se evitaría la fertilización de las formas sexuales del parásito bloqueando la transmisión de la infección a los humanos (34).

4.2.2. Estadios invasivos de *P. falciparum* en el hospedero humano

4.2.2.1. El esporozoíto

El esporozoíto es alargado con el extremo apical afinado y el posterior redondeado, tiene una longitud de 10μm, y presenta una serie de organelos entre los que se encuentran: el apicoplasto, el anillo polar (localizado en el extremo apical) que sirve como eje central de los microtúbulos y de las vesículas secretoras llamadas micronemas y roptrias, este conjunto de vesículas se conoce como el complejo apical (Figura 3) (35).

Los microtúbulos, situados debajo de la membrana plasmática unidos al anillo polar, recorren el esporozoíto desde el ápice hasta su parte media. Ellos permiten su desplazamiento y actúan durante el proceso de invasión.

El contenido de los micronemas y las roptrias, le permiten al zoito adherirse e invadir la célula hospedera e inducirla a envolver al parásito en la vacuola parasitófora, la cual, es el compartimiento intracelular donde el parásito reside, se reproduce y se diferencia a merozoítos la forma infectiva del glóbulo rojo (29, 35-37).

Las roptrias son organelos con forma de pera, que contienen proteínas y fosfolípidos, que se descargan durante la internalización del parásito.
Los micronemas son pequeñas vesículas que frecuentemente muestran una extensión similar a un cuello, las proteínas que contienen participan en el reconocimiento de la célula hospedera, la motilidad y la adherencia mediada por receptores (35).

El esporozoíto, al igual que los otros zoitos pertenecientes al género *Apicomplexa*, en su migración a través de las barreras biológicas, en los procesos de invasión a las células hospederas y en la salida de las células infectadas, requiere de un proceso activo de

motilidad conocido como “gliding”, este se da por la liberación de proteínas de adhesión que son descargadas en el polo apical y traslocadas al polo posterior del parásito mediante el motor actina-miosina, el cual está anclado en la membrana interna del esporozoíto (38, 39).

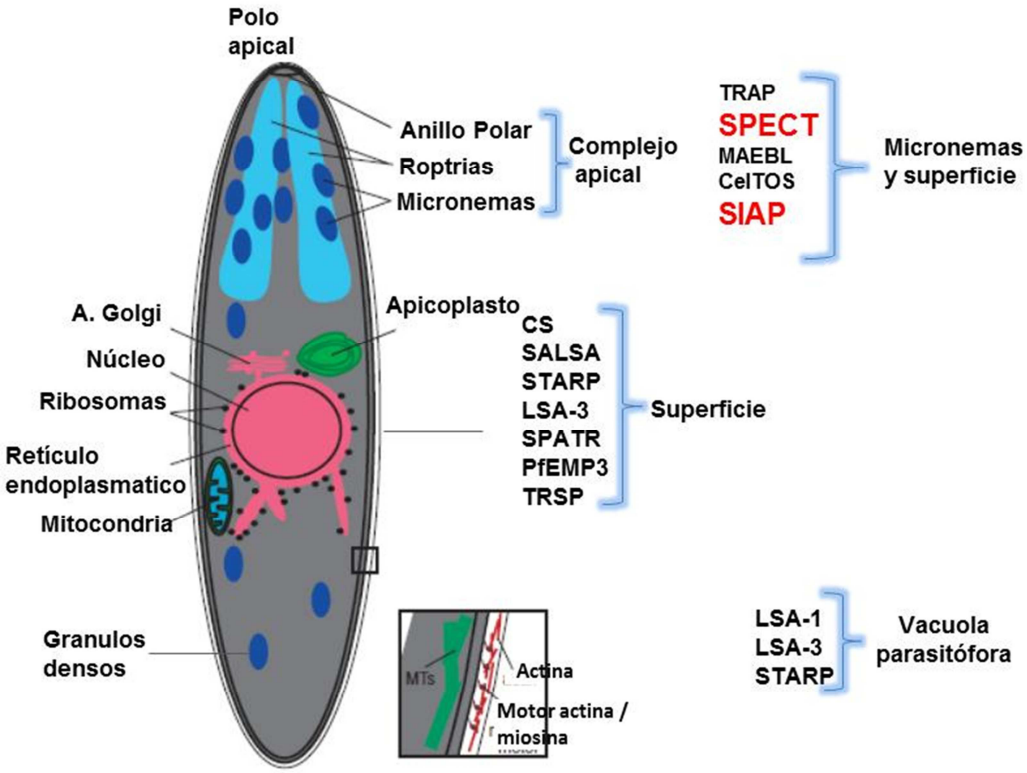


Figura 3. Características estructurales del esporozoíto y ubicación de algunas de sus proteínas (adaptado de Kappe et al. (35)).

4.2.2.2. El Merozoíto

El merozoíto es un estadio del parásito que posee la capacidad de invadir los glóbulos rojos. Presenta forma oval y mide 1.5 µm de longitud por 1 µm de diámetro. El potencial invasivo del merozoíto está dado por un complejo de organelos ubicados en uno de los extremos de la célula, llamado el complejo apical. Este complejo está conformado por diferentes organelos: los micronemas, las roptrias y los gránulos densos; también está conformado por una red de estructuras submembranales del citoesqueleto del parásito. La membrana parasitaria está constituida por dos capas. Al interior de la capa interna o

película, se encuentra una red de filamentos y los microtúbulos los cuales le dan forma y rigidez a la célula. Estos microtúbulos se originan en los anillos polares apicales, los cuales también hacen parte de este complejo (40) (Figura 4).

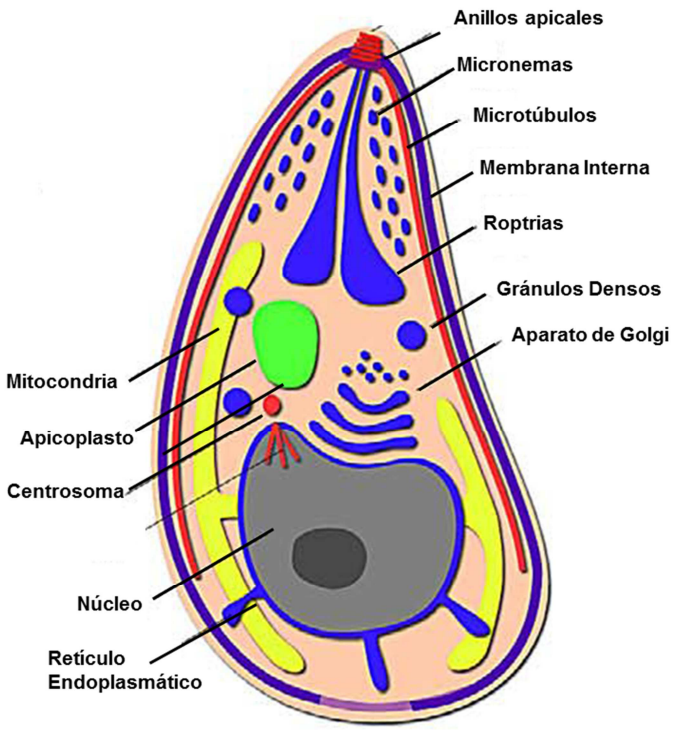


Figura 4. Características estructurales del merozoíto (adaptado de Striepen, 2007 (41)).

La invasión del merozoíto a los glóbulos rojos del hospedero, sucede en varias etapas: lo primero es la unión del merozoíto a la superficie del eritrocito, el cual se reorienta hasta que su extremo apical está cerca de la membrana plasmática, lo que induce una deformación en el glóbulo rojo, lo que provoca la liberación de una serie de proteínas que se encuentran en los organelos apicales del merozoíto, permitiendo al parásito moverse hacia dentro del eritrocito y formar la vacuola parasitófora, donde el *Plasmodium* atraviesa por diferentes estadios de diferenciación que incluyen anillos, trofozoitos y esquizontes. Durante el transcurso del proceso de invasión del merozoíto al glóbulo rojo y del desarrollo del parásito dentro de los eritrocitos el *Plasmodium* utiliza diferentes proteínas para estos procesos, las cuales están localizadas en diferentes organelos del merozoíto (Figura 5).

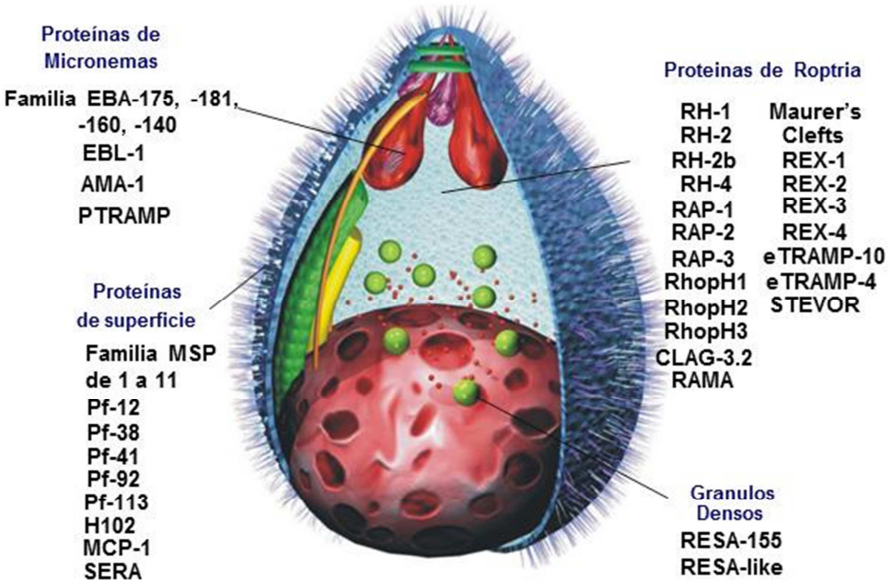


Figura 5. Ubicación de algunas de las proteínas del merozoíto (adaptado de Patarroyo 2008 (10)).

Para la fase eritrocítica se han realizado numerosos estudios de la invasión del merozoíto al glóbulo rojo, los que han permitido conocer a fondo las moléculas que participan en este proceso, así como, estudios funcionales, estructurales e inmunológicos, que han hecho entender más claramente el mecanismo de invasión del parásito a los glóbulos rojos e identificar blancos para el desarrollo de una vacuna contra la malaria (3, 13, 42-46).

Mientras que la fase pre-eritrocítica donde el actor principal es el esporozoíto, ha sido la menos estudiada, principalmente por:

a) la falta de un sistema eficaz de crecimiento de esporozoítos *in vitro,*
b) la inaccesibilidad que se tiene a esta etapa del parásito, debido al escaso número de esporozoítos presentes en el huésped mamífero,
c) el limitado conocimiento de las interacciones entre el hospedero y el parásito (15).

Sin embargo, en los últimos años con los avances en genómica y proteómica, así como, los avances en diferentes técnicas de biología molecular y celular; como la transfección, la microscopía intravital, parásitos expresando la proteína verde fluorescente (GFP-expressing parasites), mejores técnicas de cultivo celular, etc. (15); han permitido avanzar en el conocimiento de la biología del parásito en este estadio.

A continuación se mencionan algunas de las proteínas pertenecientes al esporozoíto, las cuales son de importancia para la supervivencia del parásito; en este momento vale la pena mencionar que no se hablara de proteínas del merozoíto ya que en este trabajo nos interesa el estadio pre-eritrocitico.

4.2.3. Proteínas del estadio pre-eritrocítico o exo-eritrocítico

En la actualidad existen diferentes proteínas que están relacionados con este estadio, entre las más estudiadas se encuentran: la Proteína de Superficie del Esporozoíto (*Circumsporozoite Surface Protein*-CSP) localizada en la superficie del esporozoíto, comprometida con la invasión del parásito a la célula huésped e involucrada con la maduración y desarrollo del esporozoíto (47).
Proteína Anónima Relacionada a Trombospondina *(Thrombospondin-Related Anonymous Protein*-TRAP) y Proteína Similar a TRAP *Trap-like Protein* (TLP), proteínas de adhesión relacionadas con las trombospondinas, que están involucradas con la motilidad, adherencia, invasión del parásito y supervivencia del parásito (48, 49), Proteína de membrana de eritrocito- 3 (erythrocyte membrane protein 3 - *Pf*EMP-3) involucrada en la invasión al hepatocito (50), 6-Cys, P36 y P52/P36p involucradas en el desarrollo del esporozoíto en las células hepáticas y en la formación de la vacuola parasitófora (51).

Adicional a CSP (52, 53) y TRAP (42, 52) existen otras proteínas derivadas del esporozoíto que son vitales para el parásito que han sido estudiadas en nuestro instituto (FIDIC) a nivel inmunológico y/o estructural, estas son consideradas como potenciales inmunógenos en el desarrollo de una vacuna multi-epitope, multi-estadio contra la malaria. Entre estas proteínas están: la Proteína del Esporozoíto Rica en Treonina y Asparagina (*Sporozoite Threonine and Asparagine-Rich Protein*-STARP) involucrada en la invasión de los hepatocitos (14, 52, 54); Antígeno del Estadio Hepático (*Liver-Stage Antigen 1 y 3* - LSA-1 y -3) proteínas que intervienen en la interacción inicial del parásito con la superficie del hepatocito (52, 55, 56); Proteína Secretada con Alteración del Motivo de Trombospondina (*Secret Protein with Altered Thrombospondin Repeat* - PfSPATR), proteína que participa en el reconocimiento e invasión de la célula hospedera (57); Proteína del Esporozoíto Relacionada con Trombospondina (Thrombospondin-Related Sporozoite Protein-TRSP) y el Antígeno del Esporozoíto y de la Etapa del Hígado (*Sporozoite and Liver-Stage Antigen*-SALSA), proteínas involucradas en la invasión a las células hepáticas (7, 8, 55); Proteína del Paso a Través de las Células para Oquinete y

Esporozoíto (*Cell-Transversal Protein for Ookinetos and Sporozoites*-CelTos) la cual, como su nombre lo indica, está involucrada en el paso a través de las células (proceso conocido como "cell traversal") (8, 58). En la figura 3 se puede observar la localización de estas proteínas, que resumiendo son proteínas que están involucradas en los procesos de movilidad, adhesión, invasión del parásito a la célula huésped y formación de la vacuola parasitófora, procesos vitales para la supervivencia del *Plasmodium*.

Adicionalmente, se encuentran reportadas las Proteínas de Micronema del Esporozoíto Esencial para el Paso a Través de las Células -1 y -2 (*Sporozoite microneme Protein Essential for Cell Traversal-1 and -2 -SPECT-1 y -2*) y las Proteínas Asociadas con Invasión del Esporozoíto -1 y -2 (Sporozoite Invasion-Associated Proteins -1 and -2 -SIAP-1 y -2) de las cuales se discutirá de una manera detallada en los capítulos posteriores (numeral 6 y 7, respectivamente) ya que son el objeto de este estudio.

4.2.3.1. Inmunidad protectiva en el estadio pre-eritrocítico

El grupo de Nussenzweig hacia finales de la década del 60 y del 70 demostró mediante la inmunización de ratones, monos y humanos con esporozoítos irradiados que era posible obtener inmunidad protectiva en el estadio pre-eritrocítico. En estos experimentos, la picadura de voluntarios humanos con mosquitos irradiados infectados con *P. falciparum* o *P. vivax*, mostró que este procedimiento protegía de la infección frente al reto con picaduras de mosquitos infectados no irradiados y además demostró que la inmunidad obtenida era especie-específica y estadio-específica (34, 59, 60). Sin embargo, esta estrategia tiene problemas por la dificultad de la producción masiva de mosquitos infectados que se requerirían para la vacunación de poblaciones grandes; por tal motivo, la búsqueda de vacunas eficaces desde entonces se dirigió hacia el uso de proteínas o péptidos que sean inmunogénicos (34), como es el caso de CSP cuya proteína recombinante fue utilizada en vacunación de personas, las cuales al ser retadas con picaduras de mosquitos infectados con *P. falciparum* mostraron un grado de inmunidad protectiva inducida por esta proteína (8), otros ejemplos son las proteínas STARP, SALSA, LSA-1 y LSA-3 cuyas proteínas recombinantes o péptidos sintéticos derivados de ellas fueron utilizados para evaluar la respuesta humoral en primates, donde se demostró que los antígenos LSA-1 y LSA-3 son los más inmunogénicos (61). Estas proteínas indujeron además, una buena estimulación linfocitaria y alta producción de IFN-γ *in vitro*.

La vacunación y reto de *Aotus* con la proteína LSA-3 en estudios más recientes mostró inmunidad protectiva (61).

A continuación se describirán brevemente las técnicas usadas durante la realización de este trabajo.

4.3. Síntesis química de péptidos en fase sólida. Principios generales

La síntesis de péptidos siempre ha sido un reto para la química orgánica. En la década de los 50 Vicent Du Vigneaud proporcionó un gran impulso para la biología y la química, cuando aisló, determinó la estructura y sintetizó la hormona polipeptídica oxitocina (62), trabajo por el cual recibió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1955. Sin embargo, las técnicas empleadas en ese momento en la síntesis y en la purificación de estas moléculas eran muy dispendiosas, se obtenía una cantidad muy pequeña de producto. Estos hechos estimularon a científicos como Merrifield (premio Nobel de Química en 1984) a explorar nuevas técnicas. Sus investigaciones concluyeron en una nueva técnica que llamó síntesis de péptidos en fase sólida. El primer procedimiento lo publicó en 1963, más tarde describió la síntesis del tetrapéptido Leucil-alanil-glicil-valina. No obstante, aunque la síntesis fue exitosa, esta síntesis tuvo problemas debido a que las reacciones de acople y desprotección no fueron completas, lo que conllevó a que el tetrapéptido estuviera contaminado con fragmentos más cortos. Pero en 1963 solucionó el problema usando como grupo protector de los aminoácidos el grupo terbutiloxicarbonil (t-Boc); esta y otras modificaciones dieron como resultado el mejoramiento en la eficiencia de la síntesis y le permitió obtener la bradiquinina con un alto grado de pureza, esta síntesis fue el punto de partida de la química de péptidos (63, 64).

La síntesis de péptidos en fase sólida, así llamada debido a que el péptido va creciendo anclado a un soporte sólido (63) el cual es una resina de poliestireno. Los aminoácidos utilizados en la síntesis tienen el grupo α-amino temporalmente protegido, en el caso de la síntesis en fase sólida por la estrategia t-Boc el grupo es un terbutiloxicarbonil y en el caso de la síntesis por F-moc el grupo es un 9-fluorenil-metoxicarbonil (F-moc) (65), un punto importante en los aminoácidos son los grupos funcionales de la mayoría de las

cadenas laterales que están protegidos, en el caso de la síntesis t-Boc por el grupo bencil ester (o relacionados con este), y el grupo t-butilo es usado en la síntesis F-moc (62, 65).
El primer aminoácido es unido a la resina por medio de un enlace tipo amida o ester (dependiendo del grupo funcional que tenga la resina) mediante la ayuda de una amina terciaria como lo es la N'N'-diciclohexilcarbodimida (DCC). Después de unir el primer aminoácido, la síntesis del péptido se continúa por: a) desprotección del grupo amino protegido, en la estrategia t-Boc con ácido trifluoroacético (TFA) y en la F-moc con piperidina; b) neutralización; c) acople del siguiente aminoácido, pasos que se repiten hasta terminar la secuencia deseada. Finalmente, para la estrategia t-Boc, el tratamiento con ácidos fuertes, usualmente ácido fluorhídrico (HF), remueve todos los grupos protectores permanentes de las cadenas laterales y adicionalmente el péptido es liberado de la resina (66), este paso final es conocido como clivaje bajo-alto, debido a que la remoción de los grupos protectores se realiza con una concentración baja de HF y el desanclaje del péptido de la resina utiliza una concentración mayor de HF (67). En el caso de la estrategia F-moc se usa ácido trifluoroacético en esta etapa final.
Una vez separados de la resina los péptidos son purificados mediante cromatografía liquida de alta eficiencia en fase reversa (CLAE-FR) y analizados por espectrometría de masas *Matrix-Assisted* Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight (MALDI-TOF), posteriormente se liofilizan y se almacenan para ser usados en los diferentes ensayos propuestos.

4.4. Interacción Receptor Ligando

Este ensayo se basa en la reacción de unión de un ligando a un receptor donde típicamente se llama ligando a la molécula pequeña (en este caso el péptido) y receptor a la proteína (proteína presente en la membrana de la célula en este caso la célula hospedera: HeLa). En general, se trabaja con el ligando purificado, mientras que el receptor forma parte de una muestra compleja, se varía la concentración del ligando para determinar la presencia y características del receptor.

$$R\ (\text{Receptor}) + L\ (\text{Ligando}) \longrightarrow RL\ (\text{Receptor-Ligando})$$

Esta reacción se puede tratar como un equilibrio químico

$$Kd = \frac{[RL]}{[R]\,[L]}$$

Las condiciones experimentales de estos ensayos fueron definidas para identificar las regiones de unión de alta afinidad (constante de afinidad -Kd- en el rango nanomolar), que se unen entre 2000 a 100000 sitios de unión por célula.
Se define como la actividad de unión, los péptidos que tienen una actividad de unión mayor o igual a 0.02 (2% de unión) se considera que tienen alta actividad de unión y se han denominado como *High Activity Binding Peptides* (HABPs), indicando además que hay más de 2000 receptores por célula (6, 68).

Los estudios realizados en FIDIC han demostrado que mediante el tratamiento de las enzimas heparinasa I, heparinasa II, condroitinasa AC y condroitinasa ABC, la mayoría de los HABPs pertenecientes a proteínas del esporozoíto se unen a moléculas de superficie de las células HeLa o HepG2, a través de los diferentes receptores de proteoglicanos como oligosacáridos parecidos a heparina con alto o bajo contenido de grupos sulfato, condroitina-4-sulfato y condroitina -4-6-sulfato (8, 69)

4.5. Dicroísmo Circular (DC)

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica de absorción que se utiliza en el análisis de la estructura de macromoléculas biológicas en solución (70).
La teoría de dicroísmo circular fue desarrollada por Biot y Fresnel en 1812. Un rayo de luz polarizado en un plano puede considerarse formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes de la luz polarizada circularmente, lo que provoca una rotación del plano de polarización en un ángulo α y la distorsión de este plano genera una elipse (Figura 6) (70, 71).

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes polarizados circularmente (Dicroísmo Circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación

electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación de proteínas (71).

Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido y tipo de estructura secundaria presentes (Figura 6), es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α, hojas β, giros y otros tipos estructurales) (70, 71).

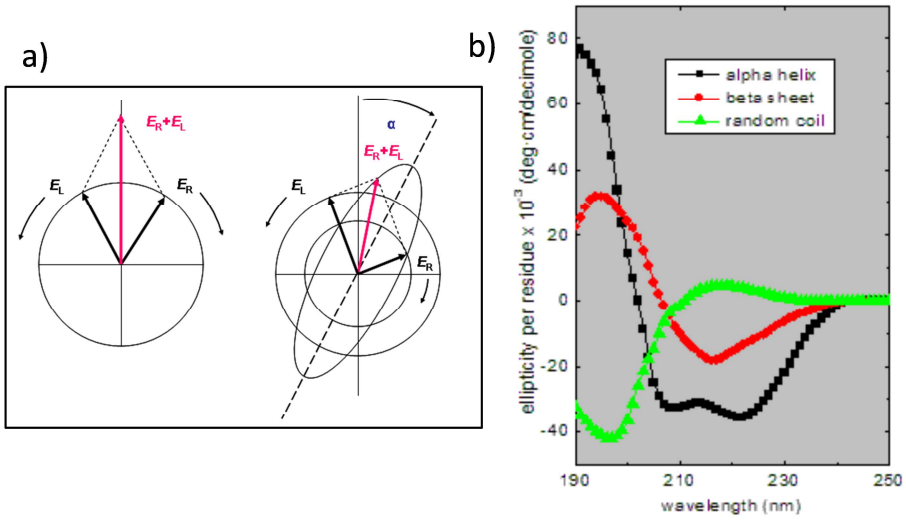


Figura 6. a) Los vectores de los componentes del haz de luz antes de llegar a la muestra y después de interactuar con la muestra, fuera de fase. b) Espectros de DC de poli-péptidos mostrando diferentes estructuras secundarias (adaptada de Arboledas 2011).

4.6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Principios generales

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear constituye una de las técnicas analíticas más utilizadas en la actualidad, gracias a su capacidad de estudiar con

resolución atómica la estructura tridimensional de moléculas en solución, sitios de unión de ligandos, cambios conformacionales, además, permite llevar a cabo estudios de tipo dinámico y cinético. Se trata de una técnica no destructiva cuyo campo de actuación no sólo pertenece a la Química, sino que encuentra cada vez más aplicaciones en la Biología y la Medicina. A lo largo de las últimas décadas, la RMN se ha consolidado como una herramienta básica en biología estructural permitiendo determinar la estructura tridimensional de biomoléculas como: péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, oligo y polisacáridos (72). Adicionalmente, es posible estudiar aspectos termodinámicos y cinéticos de fenómenos biológicos relevantes, como procesos de reconocimiento molecular, interacciones receptor-ligando y plegamientos de proteínas (73, 74). Como dichos estudios se realizan en solución, entonces, mediante la RMN es posible conocer la estructura tridimensional de proteínas en condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica definida, similares a las que se encuentran en el medio fisiológico, dando un paso significativo en la búsqueda de la relación entre la estructura y la función de estas biomoléculas (73, 75, 76).

Sin embargo, la RMN en el campo de las biomoléculas presenta limitaciones, en especial a lo que se refiere con la estabilidad y el tamaño de las proteínas, asimismo, con la complejidad de los espectros de proteínas de gran tamaño. No obstante, gracias a los avances metodológicos y de equipos, estos problemas se han venido solucionando.

Por otro lado, y de una manera sencilla el fundamento de la RMN se basa en el hecho de que la mayoría de los núcleos atómicos poseen espín, la cual es una propiedad de las partículas que componen los átomos. Al momento de introducir átomos con espín nuclear a un campo magnético externo, el núcleo se comporta como un pequeño imán y tiende a orientarse, preferentemente, a favor del campo magnético. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo magnético, se dice que el sistema está en resonancia. A este fenómeno de excitación de los espínes nucleares se le conoce como resonancia magnética nuclear. Esta energía aplicada, ΔE, corresponde a la radiación electromagnética de la región de las radiofrecuencias (75-77).

Puesto que el hidrógeno (^{1}H, protón) es el núcleo que proporciona mayor sensibilidad debido a su abundancia natural, a su valor de espín igual a 1/2 y a su constante giromagnética, estas propiedades, junto con su presencia en péptidos y proteínas hace

que la RMN de hidrógeno sea la más utilizada, en la determinación conformacional preferencial de estas moléculas, sin embargo, no se debe olvidar que también se utilizan otros núcleos, como ^{13}C, ^{15}N (cuando las proteínas tienen más de 60 aminoácidos) y ^{31}P (para ácidos nucleicos) (73, 74, 78).

Cuando se obtiene un espectro unidimensional de ^{1}H por RMN de un péptido o una proteína (Figura 7a), las señales se ensanchan debido al movimiento lento de estas moléculas en el medio acuoso. Mientras más rápido sea el movimiento molecular en el solvente, las señales son más finas. Este ensanchamiento de las señales, junto con el sobrelapamiento entre ellas provoca que los espectros unidimensionales de una proteína sean imposibles de interpretar. Sin embargo, es conveniente comenzar el análisis de un péptido con el registro de un espectro unidimensional. De esta forma se puede examinar el estado de la muestra en lo que se refiere a la presencia de impurezas, relación señal ruido y agregación (79).

Para determinar la estructura de una proteína o un péptido de bajo peso molecular (hasta 10 kDa) por RMN es requisito indispensable como mínimo la obtención de espectros bidimensionales homonucleares (^{1}H-^{1}H), y para moléculas de alto peso molecular (>10 kDa), adicional, a los experimentos homonucleares se requiere la utilización de métodos heteronucleares multidimensionales en los que se relacionan diferentes núcleos, por ejemplo ^{1}H-^{13}C, ^{1}H-^{15}N, ^{15}N-^{13}C, con el fin de encontrar dentro de la molécula los núcleos que estén acoplados entre sí (73). Esta información permite conocer el número de hidrógenos, carbonos, nitrógenos, la clase de carbono presentes en la molécula y adicionalmente determinar ^{1}H, ^{13}C y ^{15}N que se encuentran acoplados entre sí, a dos o tres enlaces.

Particularmente respecto a los espectros en dos dimensiones, estos se grafican como diagramas de contornos para que la representación sea de dos dimensiones solamente y se facilite su interpretación, como se muestra en la figura 7b.

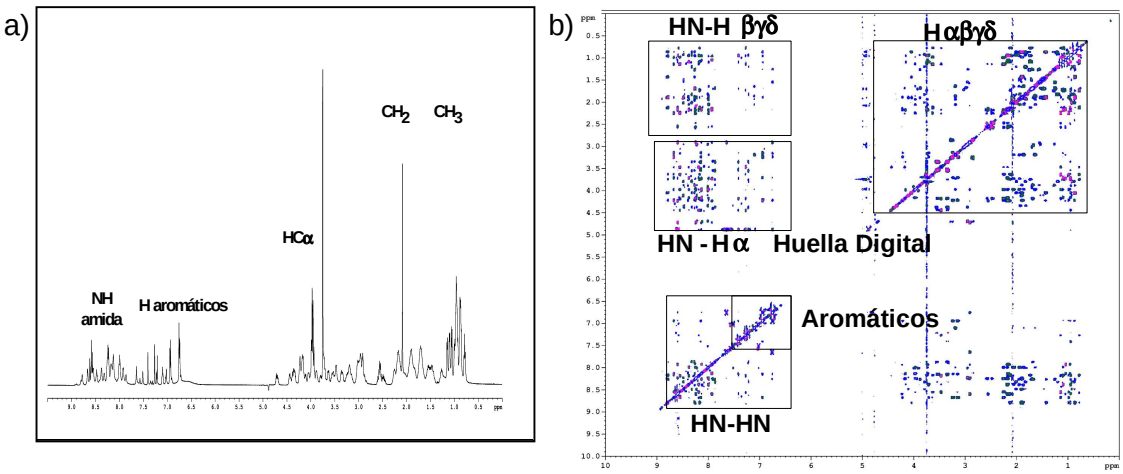


Figura 7. a) Ejemplo de espectro unidimensional de un péptido. b) Espectro en 2D de un péptido mostrando las regiones a analizar.

Siguiendo con la obtención de la estructura tridimensional de péptidos o proteínas, el primer paso consiste en conseguir la asignación de todos los protones de los aminoácidos que conforman la cadena peptídica (79), lo cual se puede realizar gracias a que a principios de la década de los 80 Kurt Wüthrich (premio Nobel de Química en 2002), propuso un protocolo eficaz y bien definido para cumplir con este objetivo (75), lo que consiguió mediante el uso de los experimentos homonucleares bidimensionales.

Existen diferentes experimentos bidimensionales de correlación homonuclear que permiten realizar dicha asignación; los que se usaron en este trabajo son: experimento COSY (COrrelation SpectroscopY) (80), experimento TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) (81) y experimento NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) (82); los cuales en su secuencia de pulsos contienen los siguientes elementos: preparación, evolución, periodo de mezcla y detección (Figura 8).

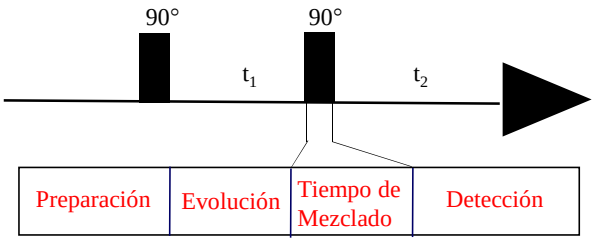


Figura 8. Esquema de la secuencia de pulsos de un experimento en 2D.

A grandes rasgos esta secuencia de pulsos se explica de la siguiente manera:

- Preparación: durante el periodo de preparación el sistema de espínes regresa al equilibrio térmico y, después, mediante los pulsos adecuados, se genera la magnetización transversal (coherencia).

- Evolución: este periodo de evolución t_1 corresponde a la segunda dimensión de los espectros 2D, durante este periodo la coherencia o magnetización evoluciona hasta alcanzar un estado que depende del valor t_1, en otras palabras los espínes evolucionan a una frecuencia determinada por su desplazamiento químico y sus acoplamientos escalares.
- Tiempo o periodo de mezclado: durante este periodo se realiza la transferencia de magnetización del núcleo A al núcleo B. Durante este periodo mediante los pulsos e intervalos de tiempo, parte o toda la coherencia que durante el periodo t_1 había evolucionado a la frecuencia de un núcleo A, se transfiere a otro núcleo B.
- Detección: durante la detección el sistema evoluciona y se registra la FID (free induction decay) cuya transformada de Fourier genera el espectro bidimensional deseado, con dos dimensiones de frecuencia independiente. Las magnetizaciones que no se han transferido totalmente en el periodo de mezclado, han evolucionado con las mismas frecuencias durante ambos periodos de tiempo dando lugar a los picos sobre la diagonal del espectro; las que se han transferido han evolucionado con distintas frecuencias en los periodos t_1 y t_2 y tras la doble transformada de Fourier, da lugar a los picos de cruce.

Veamos que, cada espectro nos da una información particular, el COSY (COrrelation SpectroscopY) (80) (Figura 9) determina las correlaciones a dos y a tres enlaces de distancia entre los núcleos que se acoplan escalarmente que pertenecen a un mismo sistema de espín. Los experimentos homonucleares, como el COSY, muestran una serie señales con las coordenadas iguales, a estas se le llama señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro unidimensional (75).

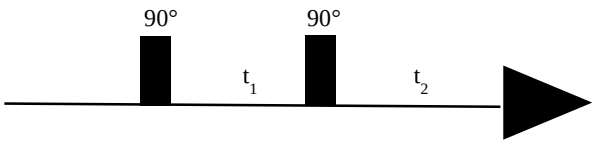


Figura 9. Esquema de la secuencia de pulsos del COSY.

Las señales que se localizan fuera de la diagonal, también llamadas pico de cruce (“cross-peak”) son las importantes, las coordenadas de ellas son los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran acoplados escalarmente a dos y a tres enlaces de distancia (Figura 10). Con esta información es posible asignar cada una de las señales de

los protones en la molécula. Para ello, es necesario utilizar el desplazamiento químico de las señales que están correlacionando (75).

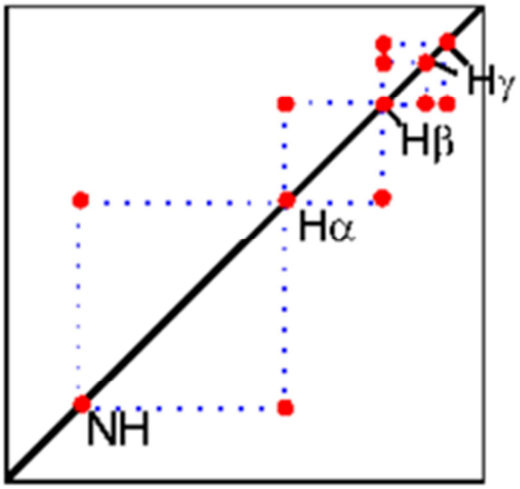


Figura 10. Interacciones a 3 enlaces de un aminoácido en un espectro COSY. (Tomado de http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20RMN.pdf)

La determinación de todos los núcleos que se acoplan entre ellos mismos es una función muy importante en la determinación de estructuras proteicas. Al conjunto de estos núcleos se le llama un sistema de espín. En una proteína, al menos hay tantos sistemas de espín como número de aminoácidos. El número de sistemas de espín es mayor, ya que en los aminoácidos aromáticos los protones de los anillos no se acoplan escalarmente a los protones alifáticos.

Entonces, para encontrar las correlaciones de todos los núcleos del sistema de espín de cada uno de los aminoácidos presente en la molécula interviene el experimento TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) (81) (Figura 11).

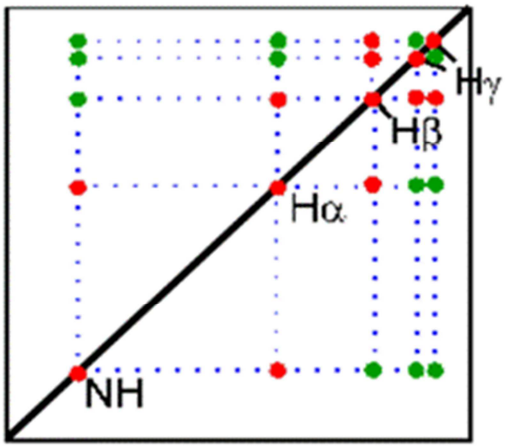


Figura 11. Sistema de espín para un aminoácido en un espectro TOCSY. (Tomado de http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20RMN.pdf)

La secuencia de pulsos de este experimento tiene en el periodo de mezclado lo que se conoce como tiempo de espín cerrado ("espín-lock") corto (2.5ms) y una secuencia de pulsos MLEV-17 o tiempo de mezcla para atenuar los NOEs transversos, la ventaja es que ocurre transferencia de magnetización neta, entre más largo sea el pulso (tiempo de mezclado) más se favorece la transferencia y puede llegar a espínes situados relativamente alejados en el sistema de espín (Figure 12).

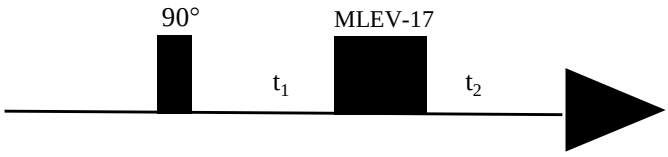


Figura 12. Esquema de la secuencia de pulsos del TOCSY.

Existe otro experimento muy importante el NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) (82), el cual genera señales fuera de la diagonal cuando los núcleos se encuentran próximos en el espacio a no más de 5 Å de distancia, en otras palabras, estas señales son resultado de la interacción dipolar espín-espín, la cual da origen al efecto NOE (Nuclear Overhauser Effect), mediado por la relajación cruzada entre núcleos próximos. La intensidad del efecto NOE es proporcional a $1/r^6$ (r = distancia), por lo tanto, los picos de cruce debidos a la correlación de núcleos que se encuentren muy cercanos serán muy intensos, mientras que los producidos por núcleos, cuyas distancias internucleares sean cercanas a 5 Å, serán débiles o inexistentes.

El efecto NOE es generado durante el tiempo de mezclado t_m (Figura 13). Dependiendo de su tamaño, en péptidos y proteínas resulta conveniente registrar varios espectros NOESY con diferentes valores de t_m, entre 100 ms y 400 ms.

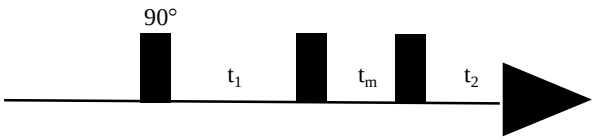


Figura 13. Esquema de la secuencia de pulsos del NOESY.

El experimento NOESY es de gran utilidad porque: a) permite asignar a los protones de aminoácidos que se encuentran contiguos, llamada la asignación secuencial y b) la determinación de protones que se encuentran alejados en la secuencia de los aminoácidos, pero cercanos en el espacio, debido a la estructura tridimensional que presenta el péptido o la proteína (Figura 14).

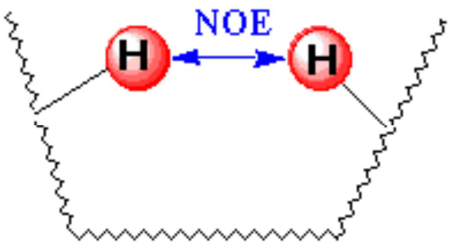


Figura 14. Interacciones NOE

Estos NOEs de larga distancia se agrupan en patrones que ayudan a definir la estructura secundaria presente en la molécula, algunos de estos NOEs o interacciones, pueden ser del tipo dαN(*i, i+2)*; dαN(*i, i+3*); dαN(*i, i+4*) *y* d$\alpha\beta$ (*i, i+3*). En la figura 15 se observan estos patrones de conectividades que identifican la estructura secundaria adoptada por la molécula (72, 75).

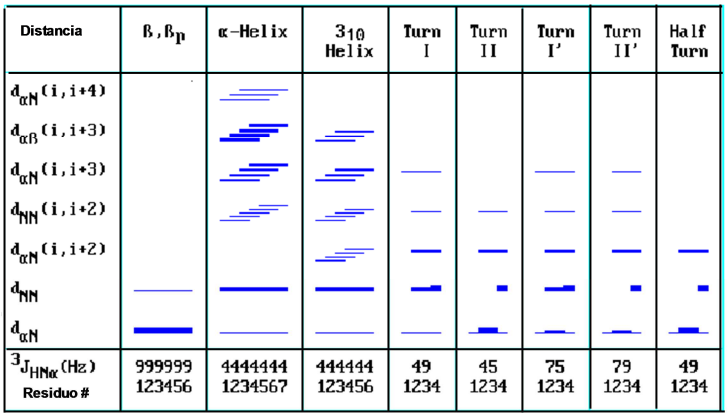


Figura 15. Patrones de conectividades para las diferentes estructuras secundarias (adaptada de Wüthrich K (75)).

En resumen, en la siguiente figura se observan más claramente las interacciones entre los hidrógenos de cada aminoácido que conforman la cadena peptídica, interacciones obtenidas por el análisis de los diferentes espectros de correlación homonuclear anteriormente mencionados.

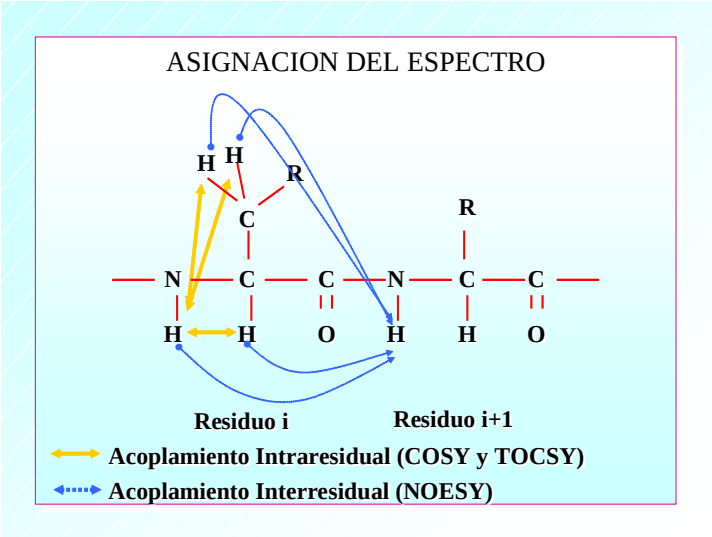


Figura 16. Interacciones de Hidrógenos obtenidos por los diferentes experimentos 2D (adaptada de Wüthrich K (75)).

En este trabajo, una vez adquiridos los espectros, determinados todos los sistemas de espín, asignadas todas las señales, establecidos los NOEs de secuencia y de medio

rango, por tanto, determinada la estructura 3D que adopto la molécula, el siguiente paso es el cálculo de la estructura.

4.7. Cálculo de Estructura Molecular

El problema básico a solucionar en cualquier determinación de estructura tridimensional utilizando datos de RMN, es el de trasladar la información disponible en los experimentos de RMN de las distancias interatómicas y ángulos diedros ("constraints") en coordenadas atómicas. Como consecuencia de esto, una variedad de métodos han sido desarrollados para calcular la estructura de proteínas usando restricciones derivadas de los experimentos de RMN.

Estos protocolos apuntan a determinar las coordenadas para los átomos de la proteína que satisfacen todas las restricciones de distancias y ángulos diedros en forma no ambigua mientras se exploran todas las regiones de espacio conformacional compatible con los parámetros observados en RMN. Los datos de RMN no solamente definen una estructura tridimensional de la proteína, sino que las restricciones son incluidas como rangos de valores permitidos, los datos contienen incertidumbres experimentales y solamente un pequeño grupo de todas las posibles distancias, ángulos diedros y puentes de hidrógeno son observables. Además, el cálculo de estructura es repetido frecuentemente para determinar un grupo de estructuras de baja energía consistentes con los datos experimentales, este será un "buen" grupo de estructuras con mínimas violaciones de los datos de RMN y con un valor maximizado de desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) entre los miembros de la familia seleccionada.

Los dos grandes métodos para la generación de estructuras son: Distancias Geométricas (Distance Geometry, DG) y Dinámica Molecular Restringida (rMD) (83). DG determina el ensamblaje de estructuras tridimensionales consistentes de un set de restricciones de distancia incompleto. Incompleto porque no todas las distancias pueden ser caracterizadas debido a que el NOE está limitado a distancias menores de 5 Å y porque las restricciones de distancia no se conocen exactamente. El método rMD es una alternativa a DG. En este método, los campos de fuerza de dinámica molecular están suplementados por términos de seudoenergía basados en las restricciones obtenidas en RMN. Estos potenciales manejan la estructura hacia una conformación que reducirá las violaciones de las restricciones durante campos de fuerzas de calentamiento y

enfriamiento. La implementación computacional más eficiente de este método usa un campo de fuerza simplificado en el cual los términos de longitudes de enlace, ángulos de enlace, fuerzas repulsivas de van der Waals son guardadas (los términos de fuerzas electrostáticas y atractivas de van der Waals son ignorados), es conocido como Simulated Annealing (SA) (84). En muchos laboratorios, se escoge un método híbrido para el cálculo de estructuras. Las estructuras iniciales son generadas por DG, con el fin de ahorrar trabajo computacional, solamente un grupo de átomos puede ser incluido para proteínas grandes. Las estructuras resultantes tienen un enrollamiento global correcto, pero una muy pobre geometría local, las cuales luego son refinadas usando rMD. El proceso de "Simulated Annealing" remueve muchas de las violaciones locales de las restricciones obtenidas por ^{1}H-RMN e inconsistencias covalentes presentes en las estructuras de DG.

La precisión con la cual una estructura puede ser calculada está directamente relacionada al número de restricciones experimentales usadas para generarla. Las estructuras son de baja resolución cuando hay pocas restricciones (como 5 por residuo), mientras que las estructuras más precisas obtenidas de los datos de ^{1}HRMN pueden tener hasta más de 15 por residuo (73). Para estos últimos casos la desviación de la raíz cuadrada de las medias (RMSD, por sus siglas en Ingles) de los átomos de la cadena principal para la estructura promedio puede ser tan baja como 0.5 Å para las regiones con estructuras secundarias bien definidas. El uso de marcaje con nitrógeno 15 (^{15}N) o carbono 13 (^{13}C) permite identificar NOEs no ambiguos, incrementando el número de restricciones por residuo (hasta 20-25) y permitiendo estructuras de más alta precisión (valores de RMSD para la cadena principal en el rango de 0.3-0.5 Å) (73). Entonces, muchos cientos de señales NOE deben ser asignados sin ambiguedad para usarlos en estos cálculos. La capacidad de asignar los grupos proquirales estéreo-específicamente (especialmente grupos $C\beta H_2$ y $C\gamma H_3$ de los residuos de valina y leucina) son críticos para obtener estructuras de alta precisión. Para los protones β–metilenos y los γ–metilos de valina las asignaciones estéreo-específicas permite la identificación de los rotámeros predominantes. Para los protones $C\beta H$ de prolina y los de la cadena lateral de asparagina y glutamina, las asignaciones estéreo-específicas son más simples y pueden ser realizados solamente sobre la base de los NOEs obtenidos.

Los puentes de hidrógeno son un suplemento útil a los NOEs y los ángulos diedros para la determinación de estructuras. Los puentes de hidrógeno son inferidos de la observación de la pendiente que se origina al graficar el desplazamiento químico de la interacción HN

de cada aminoácido de la cadena peptídica vs. temperatura. Esta interacción es analizada mediante los espectros TOCSY que han sido obtenidos a diferentes valores de temperatura (285K, 295K, 305K y 315K). Los puentes de hidrógeno usualmente son descritos por las distancias de los núcleos involucrados, utilizados en el cálculo de estructura como "constraints" de distancia (NH.....O, 1.8-2.5 Å). De esta manera los experimentos de RMN proveen una información no ambigua de la identificación de puentes de hidrógeno, en la práctica se usan, estos puentes, en las regiones bien definidas con estructura secundaria y en los cálculos iniciales de geometría de distancia (83-86).

4.8. Técnicas Inmunoquímicas

En las últimas décadas el desarrollo de ensayos basados en el uso de anticuerpos ha representado un gran avance en el análisis de sustancias de interés en la biología y en la inmunología, estos ensayos reciben el nombre de técnicas o procedimientos inmunoquímicos, los cuales presentan algunas ventajas como: a) su alta sensibilidad y especificidad, y que, b) son relativamente rápidos y sencillos (87, 88).

Las técnicas inmunoquímicas se basan en la capacidad del reconocimiento de un antígeno (Ag) por parte de un anticuerpo (Ac) específico. La propiedad que tienen los anticuerpos de unirse con alta especificidad a los antígenos, determina que estos se conviertan en reactivos muy útiles en la detección, purificación y cuantificación de una gran cantidad de analitos (Ag); adicionalmente, el hecho de que esta unión pueda ser medible por fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos como marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas, hacen que estos métodos se empleen ampliamente (89).

Existen varias técnicas que aprovechan este principio y a continuación se mencionan algunas de ellas:

- Técnicas de aglutinación: Cuando el Ag se encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado celular o bacteriano formado.
- Técnicas de inmunoensayo: Para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.

- Técnicas de radioinmunoensayo: En estas técnicas al anticuerpo se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radiactividad emitida.
- Cromatografía de afinidad: La especificidad de la unión Ag-Ac puede utilizarse para obtener Acs y Ags puros.
- Inmunoprecipitación y Western Blot. Permite detectar la presencia y cantidad de antígenos y anticuerpos específicos.

En este estudio se utilizaron las siguientes técnicas de inmunoensayo:

- Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): El propósito de la inmunofluorescencia es detectar la localización y la abundancia relativa de cualquier proteína.
Las reacciones de inmunofluorescencia se fundamentan en el marcaje del Ag o del Ac con una sustancia fluorescente (rodamina, isotiocianato de fluoresceína- FITC, etc), detectable con el microscopio de fluorescencia. En la IFI en un primer paso se usa el Ac (Ac-primario) específico no marcado, y en una segunda fase un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana (Ac- secundario), producido en conejo, cabra o cobayo, dirigido contra las fracciones constantes (Fc) de las inmunoglobulinas IgG, IgA y/o IgM. Este anticuerpo anti-inmunoglobulina humano está conjugado o acoplado a un fluoróforo (generalmente FITC) el cual reacciona de forma específica con el Ac primario (87).

- Ensayo de inmunoadsorción asociado a enzimas (ELISA): Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato especifico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (90).

- Western Blot: El término “blot” hace referencia a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma. Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección,

mientras que en la membrana, se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma. La técnica del Western Blot (también llamado “inmunoblotting” debido a que se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés) permite la identificación y caracterización de proteínas. La especificidad de la unión antígeno – anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas. En la actualidad se utiliza como criterio de identificación positivo de una proteína especifica en una mezcla compleja, para obtener datos cualitativos y semicuantitativos sobre la misma (90).

5. METODOLOGÍA

5. METODOLOGÍA

Esta sección contiene las técnicas utilizadas en la parte experimental de este trabajo.

5.1. Síntesis de péptidos en fase sólida

Los péptidos seleccionados en esta tesis, se sintetizaron por la estrategia t-Boc/Bencil (t-Boc/Bcl) que utiliza el tert-butoxicarbonil (t-Boc) como protector de los grupos α-amino y el grupo bencil (Bcl) como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos. La cadena peptídica se sintetizó sobre una resina comercial MBHA (clorhidrato de p-metilbencilhidrilamina), está resina tiene un grupo amino activo al que se le une el primer aminoácido, el crecimiento de la cadena péptida tiene lugar desde el extremo carboxilo hacia el extremo amino del péptido (91, 92).

El proceso de acople de cada aminoácido requiere los siguientes pasos:

1. El grupo protector α-amino (t-Boc) es eliminado del aminoácido anclado antes de la unión del siguiente aminoácido, la eliminación de este grupo protector es realizada con ácido trifluoroacético (TFA) al 50% por 25 min.
2. Activación del grupo α-carboxilo del aminoácido entrante con la ayuda de reactivos de acople como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) o la N,N-diciclohexilcarbodimida (DCC), con el objetivo de que el grupo α-carboxilo sea susceptible de reaccionar con el grupo amino de la cadena del péptido creciente.
3. Se lleva a cabo la reacción de acople por 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente.
4. Una vez finaliza la reacción de acople esta se monitorea mediante el test de Kaiser o ninhidrina (66).

Como se muestra en la figura 17, este proceso de desprotección, activación y acople se repite hasta completar la secuencia del péptido deseado. En el caso de los aminoácidos trifuncionales, las cadenas laterales están protegidas durante toda la síntesis para evitar polimerizaciones y reacciones no deseadas con dichas cadenas. Una vez terminada la síntesis de la cadena peptídica, se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos y se realiza separación del péptido de la resina con la metodología de alta y baja concentración de ácido fluorhídrico (HF) (66, 93).

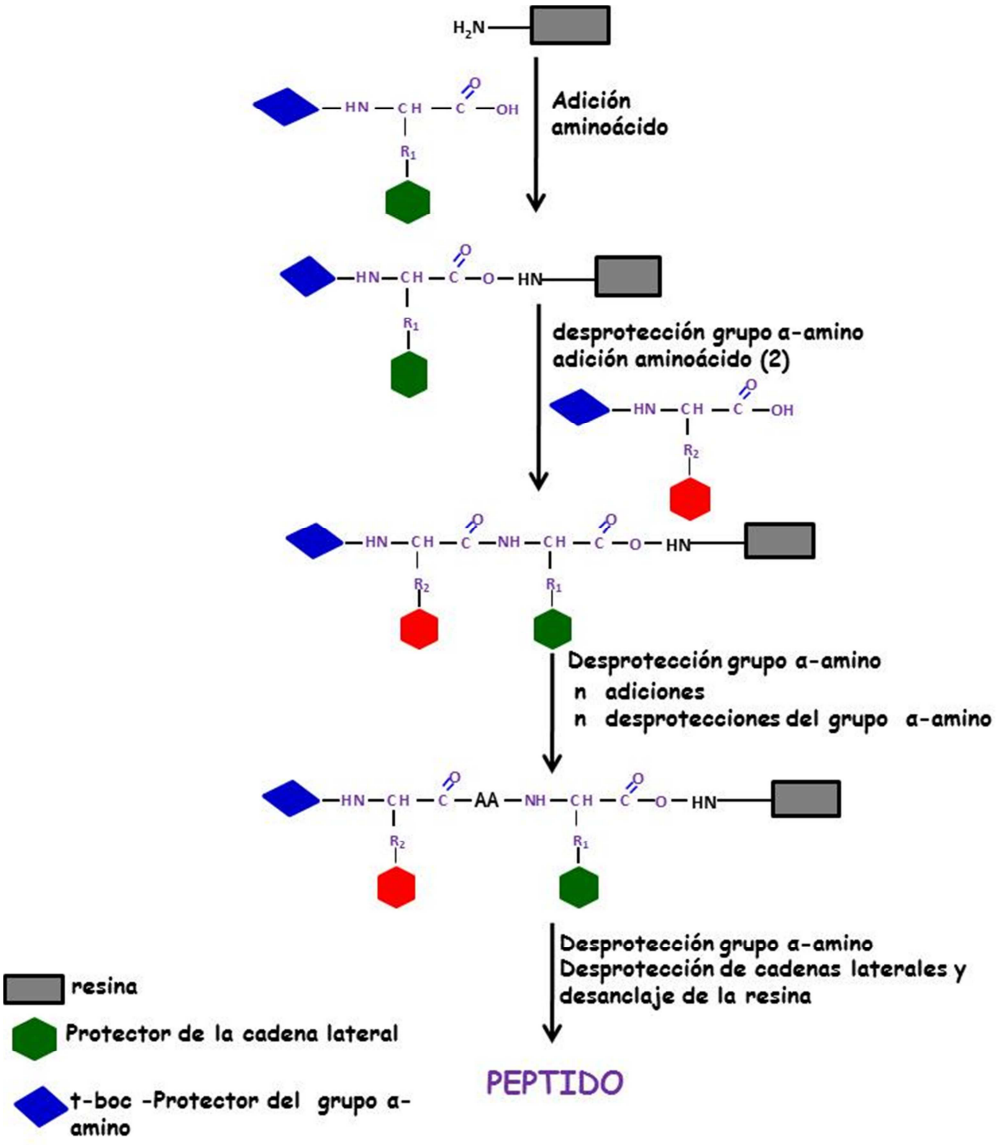


Figura 17. Síntesis de péptidos en fase Solida estrategia t-Boc/Bcl

5.2. Oxidación para la polimerización de los péptidos

Durante la síntesis del péptido se adiciona al extremo amino, residuos de cisteína y glicina (CG) y al carboxi terminal residuos de glicina y cisteína (GC) para la obtención de péptidos con alto peso molecular; mediante la reacción de polimerización, que se da por la capacidad que tiene la cisteína de formar enlaces disulfuros intercatenarios, lo que

permite la formación de polímeros (cadenas peptídicas de alto peso molecular), esta reacción de polimerización se realiza por oxidación con oxígeno a pH básico.

El procedimiento es el siguiente: después de liofilizar el péptido se disuelve a una concentración de 4 mg/mL en agua destilada, se ajusta el pH a 7 con soluciones de NaOH o HCl, luego se coloca una corriente de oxígeno a burbujeo continuo durante seis horas y se realiza la prueba de SH libres (prueba de Ellman) (94), para monitorear el proceso de polimerización. Si el ensayo de Ellman es positivo se vuelve a ajustar el pH y se continúa la oxidación hasta prueba de Ellman negativa. Una vez terminada la oxidación la solución del péptido se dializa en bolsas de celulosa de rango molecular adecuado contra agua destilada, desionizada y libre de pirógenos; durante 36 horas, con cambios, cada 2 horas. Finalizada la diálisis se centrifuga y se liofiliza la parte soluble. El producto obtenido es heterogéneo con diferentes pesos moleculares en un rango de 8 a 24 kDa determinado por cromatografía de exclusión molecular y electroforesis.

5.3. Purificación de los péptidos por cromatografía liquida de alta eficiencia en fase reversa (CLAE-FR) semipreparativa

La purificación de los péptidos sintéticos se realizó por CLAE-FR, en un equipo MERK-Hitachi, utilizando una columna RP-18 (10.0 mm x 250 mm). En el proceso de purificación se empleó un programa de gradiente ascendente de 0% hasta 100% de **B** de los disolvente orgánicos (**A:** H_2O-TFA 0.05% y **B:** CH_3CN (acetonitrilo)-TFA 0.05%) como fase móvil. En la fase móvil se utilizó el TFA como formador de pares iónicos, cuya principal función es formar un par iónico con los grupos amino del péptido, lo que mejora la resolución; la detección se realizó con un detector de UV a una longitud de onda de 210nm (13).

5.4. Caracterización de los péptidos

5.4.1. Determinación de la pureza de los péptidos por CLAE-FR analítica

La pureza de los péptidos se determinó por CLAE-FR analítica en un equipo L4250-Merck Hitachi con auto-muestreador en una columna RP18 (4.0 mm x 125 mm). Para la determinación se empleó un programa de gradiente ascendente de 0% hasta 70% de **B** de los disolvente orgánicos (**A:** H_2O-TFA 0.05% y **B:** CH_3CN-TFA 0.05%) como fase

móvil, la detección se realizó con un detector de UV a una longitud de onda de 210nm (13).

5.4.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF

El análisis se realiza en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Daltonics MicroFlex. Se prepara una solución de0.2 mg de péptido en 200 µl de una mezcla de H_2O: ACN (2:1) y 0.05 % de TFA, se toman 2 µl de esta solución y se mezcla con 18 µl de solución de matriz (Ácido α-ciano-4-hidroxicinamico/TFA). A continuación se aplican 2 µl de la mezcla péptido-matriz sobre uno de los pozos del porta muestra y se seca al aire. Posteriormente se introduce la placa en el interior del equipo y se efectúa el análisis.

5.5. Dicroísmo Circular (DC)

Los péptidos se analizan en un equipo de DC Jasco J-810. Se utilizan celdas de cuarzo cilíndricas (Hellma) de 1 mL. Las condiciones para la toma del espectro en el equipo son: corrimientos de 0.2 nm, ancho de banda 1 nm, respuesta 2 seg, sensibilidad estándar, rango de 160-190 nm, el barrido de 20 nm/min, previo al registro se hacen tres acumulaciones del espectro. Los péptidos se analizaron a una concentración aproximada 5µM solubilizados en 30% de trifluoretanol-TFE/ H_2O, se registra el espectro para cada péptido y su polímero en las mismas condiciones.

5.6. Ensayos de receptor-ligando

5.6.1. Radio-marcaje de los péptidos con ^{125}I

Los péptidos fueron radiomarcados con $Na^{125}I$ de acuerdo a la metodología descrita por Pinzón (95). Brevemente, los péptidos purificados fueron diluidos en buffer salino (HBS pH 7.12) y tratados con cloramina T y $Na^{125}I$ (100mCi/mL) por aproximadamente 15 min a temperatura ambiente, esta reacción es interrumpida con la adición de bisulfito de sodio como agente reductor. Los péptidos radiomarcados fueron purificados usando una columna de cromatografía Sephadex G-10. Posteriormente cada fracción eluida fue cuantificada en un contador gamma.

5.6.2. Ensayos de unión a células HeLa

Los ensayos de unión para cada péptido fueron realizados con células HeLa $1.2x10^6$ células fueron incubados a temperatura ambiente por triplicado con concentraciones crecientes de ^{125}I-péptido marcado (0-560nM) en presencia (unión inespecífica) o ausencia (unión total) de un exceso de péptido no radiomarcado (4 nM), HBS fue agregado y después de la incubación por 90 min a 4°C las células fueron lavadas para remover los péptidos no enlazados, los péptidos radio-marcados se cuantificaron en un contador automático gamma.

La unión específica fue calculada como la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica. La pendiente de la curva de la unión específica fue tomada como indicador para la actividad de unión y fue determinada para cada péptido. Aquellos péptidos que mostraron una actividad mayor o igual al 2% fueron definidos como péptidos de alta unión (HABPs) (68, 95).

5.6.3. Determinación de las constantes de afinidad

Los ensayos de saturación de unión se realizaron con cada uno de los HABPs utilizando células HeLa ($7.5x\ 10^7$ células/µL) a concentraciones entre 0 y 1600 nM en ausencia o en presencia de 24 µM de péptido no marcado, se adicionó buffer salino (HBS) y se incubaron a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron y un contador gamma es utilizado para medir la unión a la célula de los péptidos radiomarcados. Las curvas de saturación obtenidas se analizaron y se determinaron las constantes de disociación (Kd), el número de sitios de unión y los coeficientes de Hill (nH) para cada una de las interacciones péptido-célula. Metodología descrita por Urquiza en 1996 y otros (68, 95).

5.6.4. Ensayos de unión con tratamiento enzimático de células HeLa

Células HeLa ($4\ x10^4$ células/ µL) fueron suspendidas en HBS y tratados con 750 µU/mL de cada una de las siguientes enzimas: heparinasa I (HI), heparinasa II (HII), condroitinasa AC (CAC) y condroitinasa ABC (CABC) las cuales fueron utilizadas de acuerdo a las instrucciones del producto. Luego las células fueron lavadas y se llevó a cabo el ensayo de unión con los HABPs correspondientes. Células no tratadas se usaron como control (100% de unión).

5.7. Estudios de inmunogenicidad de los péptidos

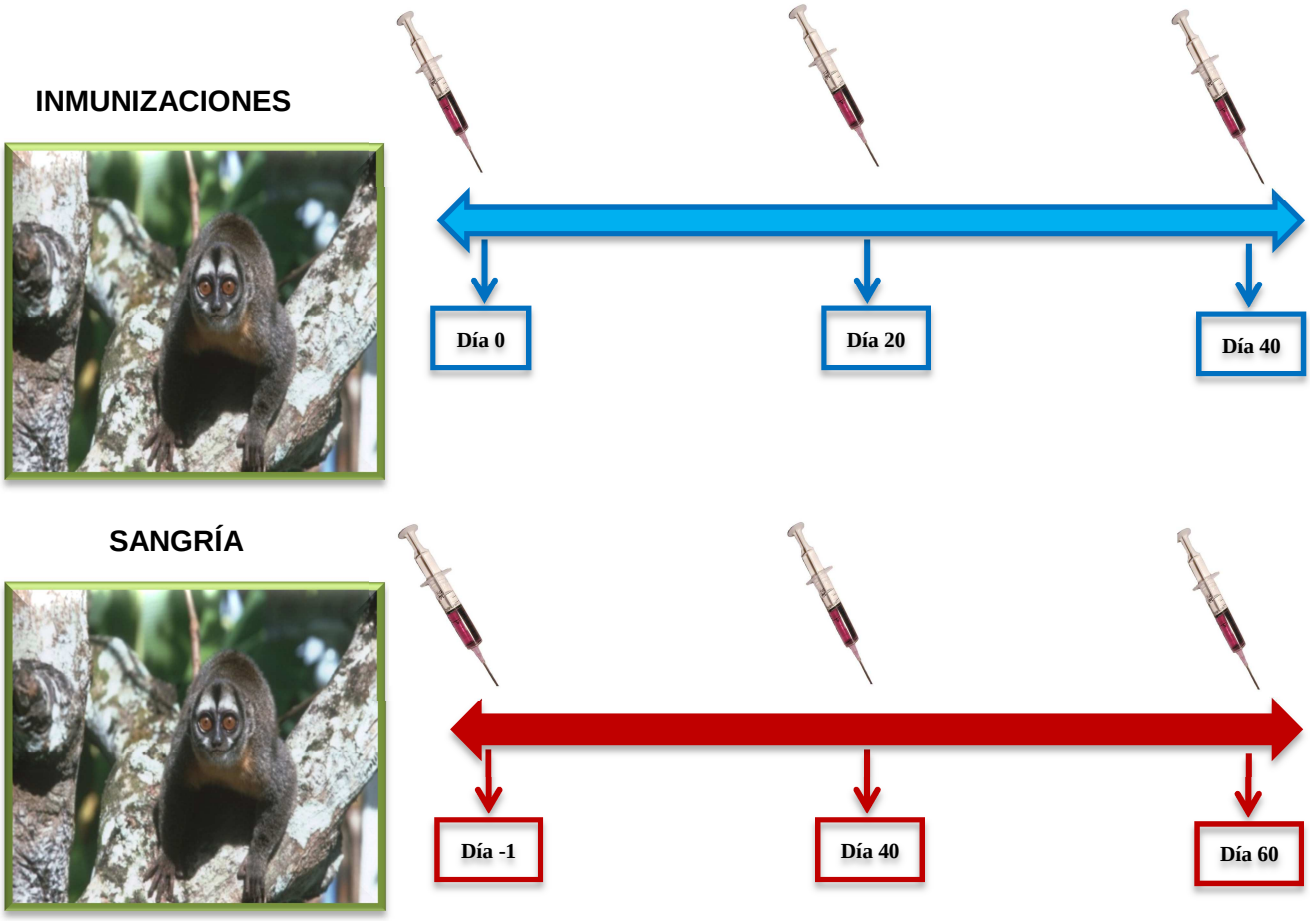
5.7.1. Animales e Inmunización

Se emplearon monos *Aotus* nativos de la selva amazónica colombiana los cuales fueron mantenidos en cautiverio en la estación de primates de la FIDIC en Leticia (Amazonas) durante el estudio, cumpliendo las normas establecidas por las leyes colombianas (ley 84 de 1989 y resolución 594 de 1996), las condiciones establecidas por la CCAC (Comité on Care and Use of Laboratory Animals, U.S.A) y el respaldo y vigilancia de CORPOAMAZONIA.

Se utilizaron grupos de 5-9 monos del genero *Aotus* para ensayar cada péptido polimérico, los cuales deben ser IFI negativos para *P. falciparum*, los monos se inmunizaron subcutáneamente en los días 0, 20 y 40 con 250 μg de cada uno de los péptidos polimerizados. En la primera inmunización el péptido se homogeniza con 200 μL de una mezcla de agua y adyuvante Completo de Freund (ACF) (50%:50%), en la segunda y tercera inmunización se usa con adyuvante incompleto de Freund (AIF). El grupo control recibió solución salina con ACF o AIF. Se tomaron muestras de sangre para estudios de anticuerpos, el día 20 después de la segunda y al día 40 después de la tercera inmunización (Figura 18). Los títulos de anticuerpos se midieron por ELISA e IFI.

5.7.2. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para el análisis de la respuesta inmune de anticuerpos inducida por los péptidos se tomaron laminas que tienen fijados esporozoítos de la cepa NF54 de *P. falciparum*, estos fueron incubados con solución de bloqueo (leche descremada al 1% en PBS) por 30 min, después se efectuaron lavados con PBS (1X) y se pusieron a secar las láminas durante 30 min. Luego se adiciono 15μL de suero a cada pozo y se incubo por 30 min a temperatura ambiente, seguidamente se lavó con PBS. Finalmente, se adiciono el anticuerpo anti-IgG de *Aotus* (obtenido en cabra) marcado con fluoresceína diluido 1:20 en PBS (1X) y se incubo durante 30 min en oscuridad total, al cabo de este tiempo se lavó con PBS (1X) y se secaron las láminas. La reactividad del suero es determinada por microscopia de fluorescencia.



Fuente de las fotos Raul Rodriguez (FIDIC)

Figura 18. Esquema del ensayo de inmunización.

5.7.3. Western blot

Se tomaron aproximadamente 125 µg de la proteína recombinante a analizar (SPECT-1 y -2 y SIAP-1 y 2, las cuales fueron obtenidas en el laboratorio de Biología Molecular de la FIDIC), se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por 3 horas a 20V. Posteriormente, se colocó la membrana con solución de bloqueo (tris-buffer salino-TBS, 1% Tween-20 y leche descremada al 5%) y se incubo por 30 min a temperatura ambiente, esto con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos que se usaron, luego se lavó con una solución de TBS - Tween 20 al 1% en PBS. Para realizar la reacción antígeno-anticuerpo, la membrana de nitrocelulosa electro-transferida se cortó en tiras de 0,4 cm y se incubaron por 30 min con una solución que contiene el anticuerpo diluido en solución de bloqueo, luego se lavó el exceso de solución con TBS-Tween 20. Después se agregó el anticuerpo anti IgG de *Aotus* (obtenido en cabra) conjugado con fosfatasa alcalina y se incubo nuevamente por

30 min a temperatura ambiente, después de este tiempo se lavó con TBS-Tween 20 y finalmente se revelo adicionando el sustrato apropiado (cloruro de tetrazolio nitro-azul, NBT/sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato, BCIP) para la detección de la proteína de interés.

5.7.4. Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas – ELISA

En los pozos de la caja de poliestireno se pusieron 10μg de cada péptido, solubilizado en 100 μL de PBS (1X) y se incubo a 37ºC toda la noche, luego se realizaron lavados con PBS (1X)-0.05% Tween-20. Para bloquear sitios inespecíficos se utilizó una solución de bloqueo (PBS (1X) - 0.05% Tween-20 - leche al 4%) y se incubo por 2 horas a 37ºC, al cabo de este tiempo se lavó con PBS (1X)-0.05% Tween-20. A continuación, se adicionaron 100 μL de los sueros diluidos en solución de bloqueo y se incubo por 2 horas a 37ºC. Posteriormente, se añadió el conjugado (anti-IgG de *Aotus* acoplado a peroxidasa) diluido 1/1000 en solución de bloqueo y se incubo por 1 hora a 37ºC. Por último, se adiciono 100 μL de la solución de sustrato (3,3',5'-tetrametilbencidina peroxidasa) y se incubo por 15 min a temperatura ambiente, se realizó la lectura de la placa en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 620 nm.

5.8. Obtención del Modelo Tridimensional de los Péptidos

5.8.1. Resonancia Magnética Nuclear (^{1}H-RMN)

Para el estudio conformacional por ^{1}H-RMN de los péptidos, se solubilizaron 10 mg de cada péptido puro en 500 μL de 30% de trifluoretanol deuterado-TFE-d3/H_20 (Cambridge Isotope 99,94%) (30/70, v/v), la adquisición de todos los experimentos se realizó a 295K y como punto de referencia se utilizó la señal del agua a 4,75 ppm.

Todos los espectros fueron realizados en un espectrómetro DRX 500 MHz marca Bruker, equipados con unidad de temperatura Eurotherm B-VT2000 y la unidad de enfriamiento BCU 05 (Bruker) con una estabilidad de temperatura de ± 0.1 °C.

El primer experimento que se tomo es un unidimensional el cual permite estandarizar todas las condiciones de corrido de los experimentos 2D.

Como se mencionó en la sección anterior se realizan 3 experimentos de RMN bidimensionales COSY, TOCSY y NOESY, los que permiten la asignación de los protones de los aminoácidos de los péptidos y para la detección de estructura secundaria en la solución. En la realización de los experimentos 2D cada muestra estuvo en el magneto aproximadamente 4 días, tiempo en el que las muestras fueron estables y permanecieron solubles.

Adicionalmente se tomaron experimentos TOCSY a diferentes temperaturas (285K, 305K, 315K), con el objetivo de encontrar los aminoácidos que estuvieron involucrados en puentes de hidrógeno, los cuales son inferidos de la observación de la pendiente ($-\Delta\delta HN/\Delta Tx10^{3)}$ que se originó de graficar el desplazamiento químico vs. temperatura. Los desplazamientos químicos HN que no varían con la temperatura, tendrán valores de coeficiente muy bajos y posiblemente estén involucrados en enlace de hidrógeno (96).

5.8.2. Cálculo de la estructura molecular

El análisis de los elementos estructurales de los péptidos como son: hélices alfa, hojas plegada beta y giros beta, se llevó a cabo con el software INSIGHT II de la compañía Accelrys, que mediante su módulo “Biopolymer” permitió construir la cadena peptídica (generando los archivos con extensión “.car” el cual contiene las coordenadas cartesianas y el “.mdf” contiene las coordenadas moleculares) a la cual se le aplicaron las restricciones en las distancias hidrógeno -hidrógeno de acuerdo a los datos de distancia de los NOE, restricciones en las distancias hidrógeno-oxígeno de acuerdo a los datos de desplazamiento químico a diferentes temperaturas y restricciones de ángulo omega, dichas restricciones o “constraints” fueron consignados en el archivo con extensión .rstrnt. Con el programa “Distance Geometry” (DG) se creó el modelo estructural el cual se refino mediante la utilización de programas de minimización y dinámica molecular implementados en DISCOVER. Se obtuvo un grupo de 50 estructuras probables y se inició un proceso bastante largo que incluyo verificar que cada estructura cumpliera las distancias interprotónicas, los ángulos y que no tuvieran energías altas, como este es un proceso interactivo, se volvió al espectro, se verificaron los NOEs, se analizó si existían violaciones de distancia y de ángulo en cada una de las 50 estructuras obtenidas y luego se escogió el grupo de estructuras que más se ajustó a los datos experimentales obtenidos por ^{1}H-RMN, este procedimiento se realizó las veces que fueron necesarias hasta obtener la familia de estructuras que mejor represento la estructura de los péptidos.

6. Determinación de la estructura tridimensional e inmunogenicidad de péptidos (cHABPs y mHABPs), derivados de las proteínas SPECT 1 y 2, búsqueda de la relación entre la estructura 3D y su actividad inmunológica

6. Determinación de la estructura tridimensional e inmunogenicidad de péptidos (cHABPs y mHABPs), derivados de las proteínas SPECT 1 y 2, búsqueda de la relación entre la estructura 3D y su actividad inmunológica

6.1. Introducción

La malaria es una de las enfermedades tropicales más importantes a nivel global, es causada por parásitos del genero *Plasmodium*, siendo el más agresivo el *Plasmodium falciparum*. Esta enfermedad es trasmitida a personas de todas las edades, pero son los niños menores de 5 años y las mujeres embarazadas el grupo más vulnerable. Alrededor del mundo se reportan aproximadamente 300 millones de casos clínicos, cerca de un millón de muertes cada año, adicionalmente la mitad de la población mundial está expuesta a adquirir la enfermedad (OMS).

A pesar de los esfuerzos de investigación realizados durante décadas, aún no se ha encontrado un tratamiento terapéutico efectivo para la malaria. Por eso surge la necesidad de continuar con los estudios del desarrollo de una vacuna eficaz contra la malaria causada por *P. falciparum* como lo viene haciendo la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) desde hace más de dos décadas. El avance es notable en este propósito, ya que se ha desarrollado una metodología robusta, lógica y racional en la caracterización de antígenos del estadio exo-eritrocítico e intra-eritrocítico del parásito, que determina específicamente las secuencias de aminoácidos de las proteínas del parásito involucradas en la unión e invasión a células HepG2, HeLa y a GR, teniendo hasta el momento un gran número de moléculas del estadio intra-eritrocitico identificadas como potenciales blancos para el desarrollo de una vacuna contra la malaria y pocas moléculas blanco de la etapa pre-eritocitica (3, 8). Entonces, siguiendo este camino y con el ánimo de contribuir con la identificación de antígenos del estadio exo-eritrocitico, en este trabajo se estudió la familia de proteínas SPECT -1 y -2.

6.2. Proteína de Micronema del Esporozoíto Esencial para el Paso a Través de las Células 1 y 2 (Sporozoite microneme Protein Essential for Cell Traversal-1 and 2 - SPECT-1 y -2)

El análisis de los genes de *spect* 1 y 2 mediante Southern blot muestra que son genes de copia única que contienen cuatro intrones, una búsqueda de este gen en el genoma de

Plasmodium revela que es conservado en algunas especies de *Plasmodium*, por ejemplo la proteína SPECT-1 de *P. falciparum* comparte el 45,6% de identidad en la secuencia cuando se compara con la SPECT-1 de *P. berghei* (97), de igual manera al realizar un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para SPECT-2 se observa que comparte un alto grado de identidad con *P. reichenowi*, *P. knowlesi* y *P. chabaudi*, entre otros. Por otra parte, ensayos de inmunofluorescencia indirecta de SPECT-1 y -2 muestran que su expresión se limita a la etapa de la glándula salival del mosquito (51, 97).

SPECT-1 de 28 kDa y SPECT-2 de 95 kDa (Figure 19) también conocida como PPLP-1 *Plasmodium* Perforine-Like Protein-1 fue la primera proteína descrita en *Plasmodium* que tiene el dominio del complejo de ataque a la membrana/perforina (membrane attack complex/perforin – MACPF) presente en su estructura (31), lo cual la hace miembro de la super-familia de proteínas MACPF y forma parte de la maquinaria que usa el parásito para invadir las células hospederas mediante la apertura de las membranas de estas células antes del paso a través de las células (98).

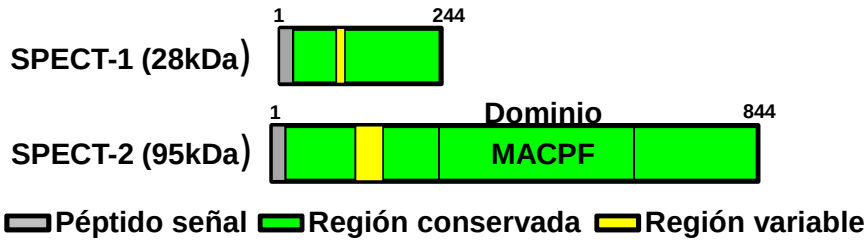


Figura 19. Representación esquemática de SPECT-1 y -2. En paréntesis se muestra el peso molecular y el largo de la barra es aproximadamente el número de aminoácidos de su secuencia.

SPECT-1 y SPECT-2 son proteínas que se almacenan en los micronemas, específicamente producidas por los esporozoítos que infectan al hígado, siendo esenciales en el viaje del esporozoíto desde las células de la dermis hasta las células de Kupffer, demostrando su habilidad de atravesar las células, fenómeno que juega un papel importante en la trasmisión del parásito de la malaria desde el vector hacia el hospedero vertebrado, y que es requerido por los esporozoítos para invadir los hepatocitos (31, 97, 99). Esto fue demostrado en un ensayo *in vivo* en el cual se utilizaron esporozoítos a los cuales se les interrumpió selectivamente los genes de *spect-1* y *spect-2* (en ensayos separados), en este estudio se encontró que se afecta la infectividad de estos

esporozoítos, y que adicionalmente, pierden por completo su habilidad de atravesar células HeLa *in vitro*, lo que confirma que las proteínas SPECT-1 y -2 son importantes en la habilidad del parásito para cruzar las barreras de la célula, especialmente en el avance del esporozoíto desde la dermis hasta el hepatocito (55, 56); mientras que aún no es muy claro el mecanismo por el cual SPECT-1 participa en este proceso, la presencia del dominio MACPF en SPECT-2 ayuda en la ruptura de la membrana de la célula hospedera por medio de la formación de poros (98) y por eso está involucrada en la migración del parásito. Además se ha observado que en ausencia de las dos proteínas no hay formación de poros en las membranas de las células hospederas como resultado del "cell-traversal", lo que sugiere que SPECT-1 y SPECT-2 trabajan juntas o de una manera consecutiva para formar el poro (100).

Recientemente fue reportada la estructura 3D de SPECT-1 por cristalografía de rayos x (100), la cual tiene una cavidad que posee ~750 $Å^3$ y se ha sugerido que puede unir un ligando especifico como otra proteína o colesterol que se encuentra sobre la membrana de las células hospederas y que tiene un volumen de ~630 $Å^3$ y que esta unión favorece un cambio conformacional en la estructura de SPECT-1 que es importante para realizar su función (100).

En un estudio realizado por Ishino y colaboradores (51) en el cual se inocularon vía intravenosa esporozoítos a los cuales se les interrumpió el gen de *spect-2*, se observa que estos esporozoítos permanecen en la circulación y que no se presentan en el parénquima hepático, lo que indica que SPECT-2 es necesaria para cruzar la capa de células sinusoidales atravesando las células de Kupffer (51); concluyendo entonces que SPECT-2 si participa en la ruptura de la membrana de la célula hospedera.
Adicionalmente, ellos demostraron que esporozoítos en los cuales se ha interrumpido el gen de *spect-2,* no pueden escapar de la vena sinusoidal mediante la invasión de las células de Kupffer, lo que sugiere que SPECT-2 puede estar involucrada en el primer paso de la invasión de la célula, rompiendo la membrana celular (51).

Por otro lado SPECT-2 también ha sido reportada en la etapa eritrocítica, más exactamente, en la vacuola parasitófora y en la membrana celular de esquizontes maduros, y la han relacionado con la salida del merozoíto del esquizonte. Garg y colaboradores demostraron que la liberación de SPECT-2 de los micronemas del

esquizonte tardío (merozoíto) es dependiente de la concentración de calcio (Ca^{+2}) intracelular y una vez es liberada, esta se une a la membrana permitiendo su oligomerización y la permeabilización de la membrana para facilitar la salida del merozoíto al torrente sanguíneo (101).

Por la importancia que tienen las proteínas SPECT-1 y -2 en la migración de los esporozoítos desde que son inoculados en la dermis del hospedero humano hasta la llegada del parásito a las células hepáticas, en el presente estudio se propone la caracterización estructural de péptidos de alta capacidad de unión a células HeLa de estas proteínas y de alguno(s) de sus análogos, que indujeron anticuerpos en monos *Aotus* contra la proteína nativa del parásito, o contra la proteína recombinante. Lo anterior, permite analizar si existe una relación entre la estructura tridimensional de estos péptidos (hasta ahora desconocida) y su actividad inmunológica.

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1. Síntesis, purificación, caracterización y ensayos de unión de los péptidos de las proteínas SPECT-1 y 2 a células HeLa

6.3.1.1. Proteína SPECT-1

En el caso de SPECT-1 se sintetizaron 12 péptidos no sobrelapados de 20 residuos, los cuales abarcan la secuencia completa de la proteína, estos fueron sintetizados en fase sólida por la estrategia t-Boc (64) y a cada uno se le asignó un número consecutivo de acuerdo al orden serial que se sigue en el grupo de síntesis química de FIDIC, esta codificación va desde el péptido número 33368 (amino terminal) hasta el 33379 (carboxi terminal).

Una vez sintetizados los péptidos, se someten a análisis por CLAE-FR y espectrometría de masas. Los cromatogramas evidencian la presencia de una sola especie mayoritaria y sus espectros de masas muestran un pico que corresponde al peso molecular teórico de cada uno de los péptidos sintetizados.

Por otra parte, como se sabe, una de las condiciones para realizar la determinación de la estructura por ^{1}H-RMN es un alto grado de pureza en las muestras, entonces a los péptidos sintetizados y caracterizados se les sometió a un proceso de purificación adicional por CLAE-FR. En la figura 20 se muestra un ejemplo de cromatograma y de

espectro de masas para el péptido 33375 purificado; el cromatograma presenta un solo pico en un tiempo de retención de 26.45 min sugiriendo la presencia de una sola especie y su espectro de masas muestra un pico en 2146,656 que corresponde al peso molecular teórico que es 2415,4; lo que confirma que los procesos de síntesis y purificación fueron exitosos.

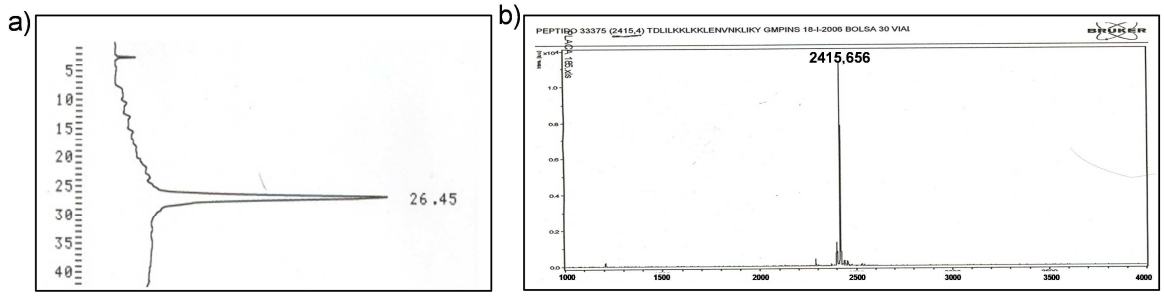


Figure 20. Caracterización del péptido 33375. a) Cromatograma obtenido por CLAE-FR. b) Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF

En la Figura 1B del anexo 1 se muestra el perfil de unión de los péptidos a células HeLa, en el cual se observa en verde las regiones conservadas de la proteína; adicionalmente se muestran unas barras negras de diferente longitud que indican cuales de estos péptidos se unen a la célula blanco con alta afinidad y los péptidos de baja unión. Entonces, para esta proteína se identificaron tres péptidos conservados de alta capacidad de unión (HABPs-conservados o cHABPs) a células HeLa, el 33372 (^{88}ASLEEVSDHVVQNISKYSLT^{107}), el 33374 (^{129}LISNLSKRQQKLKGDKIKKV*Y*^{248}) y el 33375 (^{149}TDLILKKLKKLENVNKLIKY^{168}) los cuales se encuentran localizados en la región central de la proteína. Cuando estos cHABPs se sometieron a tratamiento enzimático para conocer el posible origen de los receptores sobre la superficie de la célula a los cuales se están uniendo, se encontró que la unión de 33372 se ve afectada por CACB, lo que sugiere que se está uniendo o tiene interacciones con receptores que contienen dermatan sulfato, mientras que la unión de 33374 se vio disminuida por HI y HII, lo que indica que tiene interacciones con moléculas que contienen polisacáridos tipo heparina sulfatadas o similares y la unión de 33375 se vio afectada por todas las enzimas utilizadas, lo que plantea la posibilidad que está siendo reconocido por varias clases de proteoglicanos como los tipo heparina sulfatada, condroitin sulfato o dermatan sulfato (Tabla 1, anexo 1), conocer la clase de receptores a los cuales se unen estos péptidos es importante ya que como demostró Pradel en 2002 proteínas como la CSP del esporozoíto se unen a proteoglicanos altamente sulfatados como sulfato de condroitin y moléculas similares al

sulfato de heparina que se encuentran en la superficie de las células de Kupffer, el cual es el primer paso de reconocimiento por parte del esporozoíto en su búsqueda de la célula hepática a invadir para su desarrollo (69, 97), por lo tanto, el hecho de que estos péptidos probablemente reconozcan esta clase de proteoglicanos sulfatados indica que SPECT-1 en su paso por las células posiblemente use este tipo de receptores para pasar a través de ellas ("cell traversal"), lo que sugiere nuevamente, como se ha reportado en la literatura (99) que esta proteína es importante en el paso del esporozoíto a través de las células.

Por otra parte, la tabla 1 del anexo 1 muestra que los cHABPs reconocen entre 84,000 y 281,000 sitios de unión por célula. Además, los tres cHABPs tienen una constante de Hill mayor que 1 lo que indica que cada uno de ellos se une de manera cooperativa positiva (102), lo que significa que la unión del primer ligando o péptido a su receptor aumenta la afinidad de los otros sitios de unión por el péptido en la célula blanco.

6.3.1.2. Proteína SPECT-2

Para SPECT-2 se sintetizaron 42 péptidos no sobrelapados de 20 residuos, los cuales al igual que en SPECT-1 abarcan la secuencia completa de la proteína, el orden serial de estos péptidos inicia en el 34922 (amino terminal) y termina en el 34963 (carboxi terminal). Los perfiles que estos péptidos muestran en sus cromatogramas y espectros de masas indicaron que el proceso de síntesis fue el adecuado y por lo tanto, se logró obtener los péptidos deseados.

En cuanto al ensayo de unión a células HeLa (Figura 1B, anexo 1), se encontró que 14 péptidos conservados se unen a esta clase de células, estos se encuentran distribuidos en tres regiones de la proteína. La región I la cual es rica en cisteínas y abarca desde el residuo 21 hasta el 260 donde se encuentra el péptido 34925; la región II que va desde el aminoácido 261 hasta el 600, la cual es muy importante debido a la presencia del dominio MACPF, en este dominio están los cHABPs 34935 34936, 34938, 34939, 34941, 34946, 34949 y 34951, los cuales son bastante atractivos para ser estudiados a nivel estructural e inmunológico por pertenecer a este dominio; y por último los cHABPs 34953, 34957, 34958, 34959 y 34960 en la región III también rica en cisteínas y que incluye los

residuos 601 a 842. En la tabla 1 se observan las secuencias y ubicación de estos péptidos en la proteína.

Al realizar el estudio enzimático para conocer la naturaleza de los receptores, a los cuales se unen estos cHABPs, se encontró que: 34925, 34936, 34939, 34949, 34958 y 34959 fueron afectados por HI y CAC, lo que indica que estos cHABPs tienen interacción con moléculas de proteoglicanos similares a sulfato de heparina y a sulfato de condroitina; adicionalmente el 34939 también se une a moléculas que contienen dermatan sulfato; al péptido 34951 solo CACB fue capaz de disminuir su unión, sugiriendo su interacción con proteoglicanos que tienen dermatan sulfato y sulfato de condroitina; 34960 fue influenciado por HI, lo que revela su unión específica a moléculas del tipo sulfato de heparina; y por ultimo 34949 se vio afectado por todas las enzimas estudiadas sugiriendo que interacciona con los proteoglicanos antes mencionados (Tabla 1, anexo 1). Estos resultados obtenidos para SPECT-2 junto con los de SPECT -1 sugieren que una posible vía por la cual estas 2 proteínas median el proceso del paso del parásito a través de las células ("cell traversal") sea el uso de receptores del tipo proteoglicanos localizados sobre la superficie de la célula, al igual que lo hace la proteína CSP (69).

Tabla 1. Secuencia y ubicación de los cHABPs pertenecientes a SPECT-2

Región	cHABP	Secuencia
I (21-260)	34925	^{61}VLCNSILCKNDKISSFINQRY^{80}
II (261-600) Presencia del dominio MACPF	34935	^{261}EADSLIDPGYRAQIYLMEWA^{280}
	34936	^{281}LSKEGIANDLSTLQPVNGWIY^{300}
	34938	^{321}YTKSLSAEAKVSGSYWGIAS^{340}
	34939	^{341}FSASTGYSSFLHEVTKRSKK^{360}
	34941	^{381}WDKTTAYKNAVNELPAVFTG^{400}
	34946	^{481}SAGGSTDVNSSNSSANDEQSY^{500}
	34949	^{541}KLTPISDSFDSDDLKESYDK^{560}
	34951	^{581}DKDIIKILTNADTVTKNSAP^{600}
III (601-842)	34953	^{621}NFWDNTNALKGYNIEVCEAG^{640}
	34957	^{701}SSSGRINSAEYVYSTPCIPG^{720}
	34958	^{721}MKSCSLNMNNDNQKSYIYVL^{740}
	34959	^{741}CVDTTIWSGVNNLSLVALDGY^{760}
	34960	^{761}AHGKVNRSKKYSDGELVGTC^{780}

Por otra parte, estos cHABPs reconocen entre 19,000 y 360,000 sitios de unión por célula y presentan una cooperatividad positiva debido a que su constante de Hill es mayor a 1 (Tabla 1, anexo 1), lo que indica que la afinidad de unión de los péptidos a las células blanco se favorece.

6.3.2. Localización de SPECT-1 y -2

La identificación de epítopes B contra estas dos proteínas y su inmunización esta descrito en la sección de materiales y métodos (2.2) del anexo 1, sin embargo, es necesario mencionar que se obtuvieron 2 péptidos como posibles epítopes B para cada una de las proteínas (Tabla 2), para SPECT-1 se sintetizaron, se polimerizaron, se mezclaron e inocularon los péptidos 37339 y 37340 (mezcla A), en el caso de SPECT-2 se inoculo la mezcla B que contiene los péptidos poliméricos 37343 y 37344 (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de posibles epitopes B para SPECT-1 y -2

Proteína		Péptido	Secuencia
SPECT-1	Mezcla A	37339	CG^{44}DVEDDSKNEIVDNIQKMVDD^{63}GC
		37340	CG^{209}NNDDIKEIELVNFISTNYDK^{228}GC
SPECT-2	Mezcla B	37343	CG^{121}NNSDEEQIENSNNNNSDEEQ^{140}GC
		37344	CG^{201}DKEKRLNFNGDQKDEDNEEN^{220}GC

Los sueros de conejo obtenidos contra las mezclas A y B permitieron detectar la localización de las proteínas SPECT-1 y -2 mediante IFI (ver materiales y métodos (2.3) del anexo 1). En estos ensayos se detectó fluorescencia dada por la FITC en la superficie del esporozoíto y en unas pequeñas estructuras intracitoplasmáticas, lo que sugiere su origen en los micronemas y la translocación a la superficie del esporozoíto, para mediar el proceso de invasión al hepatocito como sucede con CSP y TRAP (35). Por otro lado, en el ensayo de colocalización que se realizó con anti-CSP producido en *Aotus* y marcado con rodamina, se observó un comportamiento similar de fluorescencia característico sobre la membrana del esporozoíto, al igual que el marcaje observado en los micronemas, lo que confirma la presencia de las proteínas SPECTs en la superficie del esporozoíto y su localización en los micronemas (Figura 1A, anexo 1).

6.3.3. Diseño de péptidos modificados

En los últimos años en nuestro grupo se desarrolló un concepto conocido como silencio inmunológico, el cual describe la actividad inmunológica nula que muestran los cHABPs; es decir, estos péptidos no son antigénicos porque no son reconocidos o son débilmente reconocidos por antisueros de pacientes que han tenido uno o más episodios de malaria causada por *P. falciparum*; tampoco son inmunogénicos debido a que no son capaces de inducir anticuerpos después de ser inmunizados y no son capaces de inducir protección contra la enfermedad (3, 8). Sin embargo, se han realizado diferentes estudios en los cuales se ha alterado este comportamiento inmunológico, al modificar algunas características químicas de estos cHABPs, lo que se logra al hacer cambios en algunos de los aminoácidos críticos en la unión, obteniéndose lo que llamamos HABPs modificados (mHABPs), los cuales, si son inmunogénicos e inductores de protección, debido a que presentan un mejor ajuste en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II, en los humanos corresponde a HLA-DRβ*). Dichos aminoácidos críticos deben ser sustituidos por otros cuya cadena lateral sea similar en masa molecular y en volumen pero con diferente polaridad; algunos de estos cambios son: F—R; W—Y; L—H; P—D; M—K; C—T o V; Q—E, A—S (3, 8, 9, 103).
Con base en lo anterior se tomaron los cHABPs 33375 de SPECT-1 y 34935, 34936, 34938, 34941, 34949 y 34951 de SPECT-2 (los cuales pertenecen al dominio MACPF) para diseñar los mHABPs correspondientes. Estos mHABPs son sintetizados, caracterizados, polimerizados y usados para inmunizar monos *Aotus*.

Las secuencias de los mHABPs diseñados para las proteínas SPECT -1 y -2 se muestran en la tabla 3 y 4, respectivamente:

Tabla 3. Secuencias de mHABPs pertenecientes a SPECT-1

Péptido	Secuencia
33375	TDLILKKLKKLENVNKLIKY
38150	TDLILKALGKLQNTNK
38152	TDHILKKLKKLQNTNK

En esta tabla 3 se observa el péptido 33375 que corresponde al péptido nativo y resaltados en negrita los números con los cuales se codificaron los mHABPs sintetizados.

De aquí en adelante los números de los péptidos que se encuentran en negrita corresponden a mHABPs. Además, en rojo se observan los aminoácidos que fueron cambiados.

En la tabla 4 se observan los péptidos nativos o conservados 34935, 34936, 34938, 34941, 34949 y 34951, con sus respectivos péptidos modificados

Tabla 4. Secuencias de mHABPs pertenecientes a SPECT-2

Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia
34935	EADSLIDPGYRAQIYLMEWA	34949	KLTPISDSFDSDDLKESYDK
38098	EADSLNDPGYRAQIYLMLWA	**38114**	KLTPNSDSFDSDDKKESYDK
38100	EADSLNDPGYRAVIYLMLWA	**38126**	KLTPISDSFDSDDNKESYDK
38130	EADSLIDPGYRAVIYLMVWA	**38128**	KLTPISDSFDSDDTKESYDK
		38888	KLTPNSDSFDSDDKMESYDK
34936	LSKEGIANDLSTLQPVNGWIY	**38958**	KLTPISDSFDSDDNMESYDK
38972	LSKEGHANDLSPLQPVNSWI	**38960**	KLTPISDSFDSDDTMESYDK
38974	LSKEGHANDLSPLQPVNDWI		
		34951	DKDIIKILTNADTVTKNSAP
34938	YTKSLSAEAKVSGSYWGIAS	**38116**	SKDIIKILTNADTVTKNSAD
38890	SDYTKALAAEAKVSGSYWGI	**38118**	SKDNNKILVNADTVTKSSAD
38892	SDYTKAHAAEAKVSGSYWGI	**38124**	DKDNNKNHVNADTVTKQSAD
38962	SDYTMAHAAEAKVSGSYWGI		
34941	WDKTTAYKNAVNELPAVFTG		
38092	WDKTTAYKNAVNELDAVFTG		
38094	WDKTTAYKNSVNELDAVFTG		
38120	WDKTTAYKIAVDEHDAVFTG		

6.3.4. Determinación de la Estructura Tridimensional

Se realizó la determinación de la estructura 3D de los cHABPs y los mHABPs por dicroísmo circular, por ^{1}H-NMR y cálculo de estructura, siguiendo el protocolo mencionado en la sección de metodología.

Inicialmente se usa el DC como un análisis previo para determinar si el péptido presenta estructura secundaria como α-hélice o β-turn, si es así, entonces se determina esta estructura y la región de aminoácidos que abarca por medio de la ^{1}H-NMR. Vale la pena

aclarar que a pesar de que algunos péptidos tengan estructura secundaria preferente determinada por DC, no se puede realizar su estudio por ^{1}H-NMR debido a que son insolubles en el solvente y en la concentración requerida para realizar dicho análisis.

6.3.4.1. Proteína SPECT-1

6.3.4.1.1. Determinación de la estructura de los cHABPs 33372, 33374 y 33375

6.3.4.1.1.1. Dicroísmo Circular

Los espectros de DC para los tres péptidos (Figura 21) mostraron un máximo positivo de absorción intenso en 190nm (correspondiente a la transición π-π*) y dos mínimos negativos de absorción, uno en 209 nm (transición π-π*) y el otro en 222 nm (transición n-π) (104), los cuales son característicos de una estructura secundaria del tipo α-hélice (104).

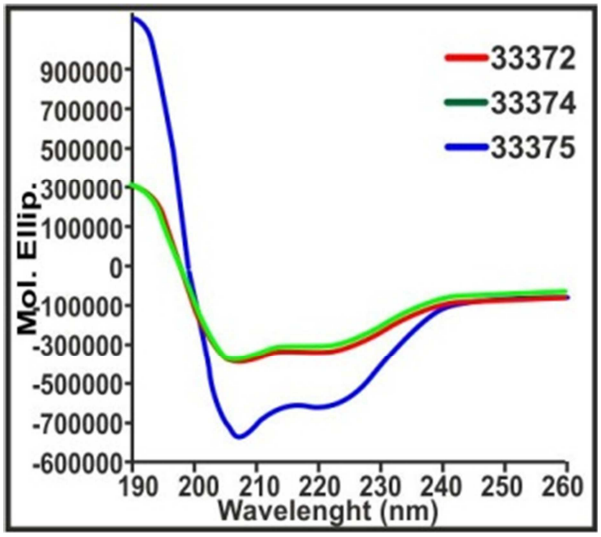


Figura 21. Espectro de DC de los cHABPs 33372, 33374 y 33375, mostrando su comportamiento α-helical

El análisis por DC del cHABP 33375 muestra un patrón de estructura secundaria correspondiente a una α-hélice y la determinación de la estructura por ^{1}H-RMN permite conocer los aminoácidos implicados en la formación de la estructura helical. Aunque los cHABPs 33372 y 33374 mostraron un patrón de estructura secundaria similar, fue imposible llevar a cabo la determinación de la estructura por ^{1}H-RMN, debido a la insolubilidad que estos presentaron en la concentración requerida para este análisis (10 mg de péptido en 30% de TFE-d3/H2O (v/v)). Aunque se evaluó la solubilidad en otro tipo

de solventes como el DMSO (dimetil-sulfoxido) se decidió no realizar el análisis por ^{1}H-RMN porque se deseaba tener todos los péptidos en las mismas condiciones para determinar la relación estructura-función.

La determinación de la estructura 3D por ^{1}H-NMR para el cHABP 33375 se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Wutrichk (75), utilizando los experimentos homonucleares bidimensionales COSY, TOCSY y NOESY. A continuación se menciona como se realizó la determinación estructural de una manera detallada.

6.3.4.1.1.2. ^{1}H-Resonancia Magnética Nuclear del cHABP 33375

6.3.4.1.1.2.1. Asignamiento

La identificación del sistema de espín para los aminoácidos se realizó mediante el COSY y el TOCSY como se mencionó en la sección anterior, en el COSY solamente se observan las correlaciones entre protones acoplados escalarmente, es decir los que se encuentran a dos o tres enlaces y son el resultado del ángulo de torsión phi (φ) entre el Hα-NH de cada aminoácido, lo que significa que para un péptido de 20 residuos como lo es este caso, se deben observar 20 señales, sin embargo, para este péptido solo se observaron 19 señales correspondientes a 19 aminoácidos, en este caso no fue posible determinar la señal 20 la cual se le atribuye a la treonina con la cual inicia la secuencia del péptido, debido a que este residuo no está acetilado en su amino terminal, lo que permite que los hidrógenos del grupo amino de la Thr se intercambien fácilmente con el solvente y por tanto no se observa la interacción Hα-NH en el experimento; por otro lado, con el TOCSY (Figura 22a) se observaron las correlaciones entre los protones HN con Hα, Hβ, Hγ y Hδ; Hα con Hβ, Hγ y Hδ.

En la figura 22(b) en la parte superior, hacia campo bajo alrededor de 9.0 a 7.5 ppm en una dimensión y entre 5.0 y 4.0 ppm en la otra dimensión se encuentra la zona que se conoce como huella dactilar, donde se encuentran las correlaciones entre HN y Hα para cada aminoácido, hacia la parte media del espectro (2.5 a 3.5 ppm) se encuentran los desplazamientos químicos de protones Hβ correspondientes a aminoácidos con sistema de espín tipo AMX como la Asn, Asp y Tyr presentes en el 33375, en la parte superior (2.1–1.6 ppm) se encuentran los protones Hβ, Hγ y Hδ de aminoácidos como Leu, Ile, Val, Glu y Lys, también en la parte superior alrededor (1.5-0.5 ppm) se observan los protones Hγ y Hδ de Ile y Val.

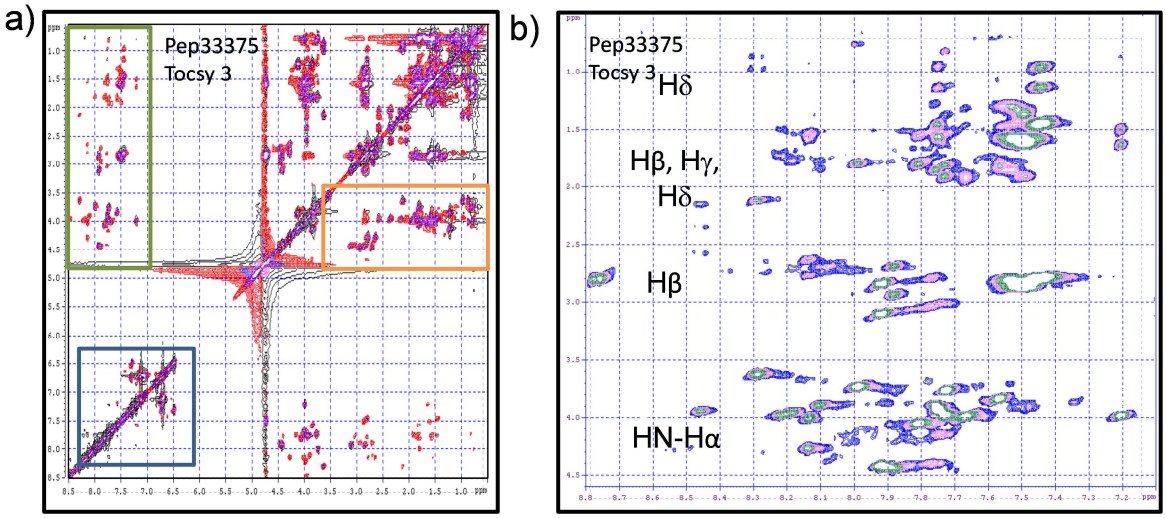


Figura 22. Espectro TOCSY del cHABP 33375. a) Vista del espectro completa, región de interacciones HN con los hidrógenos de la cadena lateral (Hα, Hβ, Hγ y Hδ), región de interacción entre Hα con Hβ, Hγ y Hδ), región de interacción entre los HN de los aminoácidos vecinos y se observan los H de cadenas laterales de aminoácidos aromáticos; b) región HN, Hα, Hβ, Hγ y Hδ.

En la figura 22(b) en la parte superior, hacia campo bajo alrededor de 9.0 a 7.5 ppm en una dimensión y entre 5.0 y 4.0 ppm en la otra dimensión se encuentra la zona que se conoce como huella dactilar, donde se encuentran las correlaciones entre HN y Hα para cada aminoácido, hacia la parte media del espectro (2.5 a 3.5 ppm) se encuentran los desplazamientos químicos de protones Hβ correspondientes a aminoácidos con sistema de espín tipo AMX como la Asn, Asp y Tyr presentes en el 33375, en la parte superior (2.1–1.6 ppm) se encuentran los protones Hβ, Hγ y Hδ de aminoácidos como Leu, Ile, Val, Glu y Lys, también en la parte superior alrededor (1.5-0.5 ppm) se observan los protones Hγ y Hδ de Ile y Val.

Ahora bien, ¿cómo se determina el sistema de espín de los aminoácidos?, lo explicare de una manera sencilla; si se observa la figura 23 se puede ver una línea vertical que se traza desde la parte inferior hasta la superior del espectro, en el recorrido de esta línea se encuentran una serie de señales que corresponderán, según su desplazamiento químico (observando la tabla de desplazamiento dada por Wütrichk (75)) a la interacción del NH del aminoácido correspondiente con los H de su cadena lateral, para el caso de la Val se observan las siguientes interacciones:

a) Interacción con coordenadas 8,28 y 3,64 ppm, que corresponde a la correlación HN-Hα;
b) Interacción con coordenadas 8,28 y 2.13 ppm, que corresponde a la correlación HN-Hβ;
c) Interacción con coordenadas 8,28 con 0,98 y 0,87 ppm que corresponde a la correlación HN-HγCH_3.

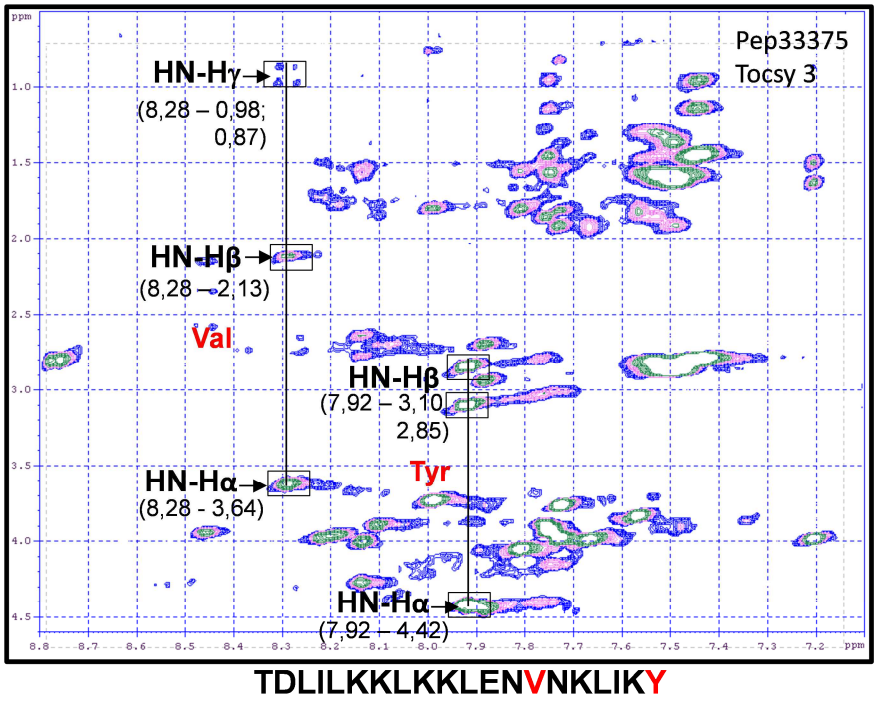


Figura 23. Región del espectro TOCSY en la que se distingue el sistema de espín para Val y Tyr.

Realizando este procedimiento se identificaron los sistemas de espín para todos los aminos ácidos de la cadena peptídica; los cuales además fueron confirmados en la región del espectro donde se observan las interacciones o “cross peak” entre el Hα con Hβ, Hγ y Hδ. Los valores de desplazamiento químico para cada hidrógeno de los diferentes aminoácidos están consignados en la tabla 5.

Tabla 5. Desplazamiento químico de los protones de los aminoácidos del cHABP 33375

Péptido 33375				
AA	**HN**	**Hα**	**Hβ**	**Otros**
T				γ(CH_3)=1,25
D	7,769	4,42	3,09; 2,80	
L	8,130	4,00	1,60; 1,60	γH=1,54 δ(CH3)= 0,87; 0,79
I	7,568	3,85	1,80	γ(CH_2)= 1,55; 1,11 γ(CH_3)= 0,78 δ(CH_3)=0,76
L	7,725	4,01	1,61; 1,53	δ(CH3)= 0,80
K	7,810	4,04	1,90; 1,81	γ(CH2)=1,58; 1,58 δ(CH2)=1,66; 1,66 ε(CH2)=2,89; 2,89
K	7,755	3,91	1,84; 1,79	γ(CH2)=1,28; 1,28 δ(CH2)=1,56; 1,56 ε(CH2)=2,79; 2,79
L	8,100	3,90	1,87; 1,79	γH=1,73 δ(CH3)= 0,87; 0,85
K	7,665	3,99	1,93; 1,88	γ(CH2)=1,47; 1,47 δ(CH2)=1,57; 1,57 ε(CH2)=2,82; 2,82
K	8,220	3,98	1,72*	γ(CH2)=1,38; 1,38 δ(CH2)=1,50; 1,50 ε(CH2)=2,86; 2,86
L	8,183	3,96	1,79*	γH=1,55 δ(CH3)= 0,77; 0,77
E	8,460	3,95	2,15 2,05	γ(CH2)= 2,57; 2,37
N	7,880	4,45	2,94 2,69	γNH2=7,45; 6,99
V	8,284	3,64	2,13	γ(CH3)= 0,98; 0,87
N	8,134	4,28	2,79 2,64	γNH2=7,40; 6,89
K	7,738	4,00	1,93 1,82	γ(CH2)=1,45; 1,45 δ(CH2)=1,59; 1,59 ε(CH2)=2,85; 2,85
L	7,724	3,78	1,54	δ(CH3)= 0,89
I	7,990	3,75	1,82	γ(CH_2)= 1,47; 1,31 γ(CH_3)= 0,87 δ(CH_3)=0,80
K	7,750	3,92	1,54 1,48	γ(CH2)=1,32; 1,32 δ(CH2)=1,48; 1,48 ε(CH2)=2,93; 2,93
Y	7,918	4,42	3,10 2,85	2,6H= 7,23 3,5H=6,92

6.3.4.1.1.2.2. Asignación de NOEs secuenciales y de media distancia

Para llevar a cabo estas asignaciones, se parte de los sistemas de espín de los residuos identificados mediante el espectro TOCSY, los cuales son nuevamente asignados en el espectro NOESY, luego se miran las interacciones entre el Hα del residuo *i* con el HN del residuo *i+1*, lo que permite encontrar la secuencia del péptido, estas interacciones se buscaron trazando una línea horizontal desde un "cross-peak" Hα*i*-HN*i* previamente identificado (o sea la señal correspondiente a un aminoácido) hasta encontrar una interacción que no haya sido asignada y que al trazar una línea vertical a partir de ella conecte con otra señal Hα*i*-HN*i* (que corresponde a un aminoácido vecino en secuencia al anterior) como se muestra en la figura 24 en las líneas de color negro, también en esta figura se muestran las correlaciones de este tipo en color rojo.

Una vez se encontró la secuencia del péptido, esta se confirmó mediante las interacciones entre los H de la cadena lateral del aminoácido *i* con el HN del aminoácido *i+1*, para este péptido se encontraron las siguientes correlaciones: L3Hβ1-I4HN, L3Hβ2-I4HN; L8Hβ1-K9HN, L8Hβ2-K9HN, L8Hγ-K9HN; L11Hβ1-E12HN, L11Hβ2-E12HN y L11Hγ-E12HN; E12Hβ1-N13HN y E12Hβ2-N13HN; N13Hβ1-V14HN y N13Hβ2-V14HN; K19Hβ1-Y20HN y K19Hβ2-Y20HN, adicionalmente en la región inferior izquierda del espectro (Figura 22a)

donde se encuentran las interacciones entre el HN del aminoácido *i* con el HN del *i+1* se hallaron las siguientes correlaciones D2HN-L3HN, I4HN-L5HN, L5HN-K6HN, K6HN-K7HN, K7HN-L8HN, K9HN-K10HN, L11HN-E12HN, E12HN-N13HN, V14HN-N15HN, K16HN-L17HN, L17HN-I18HN, I18HN-K19HN, K19HN-Y20HN (Anexo 2); todas estas interacciones reconfirman la secuencia del péptido.

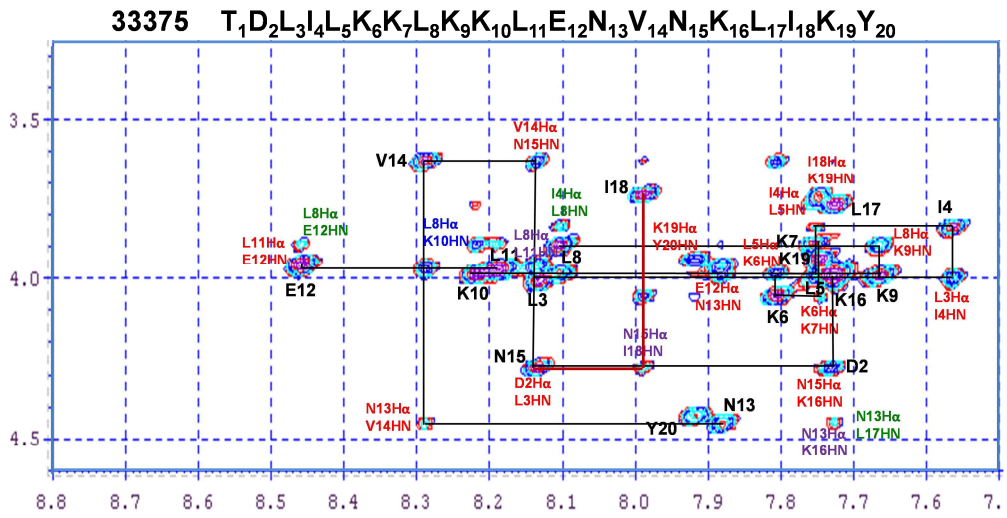


Figura 24. Espectro NOESY región de interacción entre HN y Hα, en color rojo se observan las interacciones Hα*i*–HN*i+1,* en azul oscuro los "cross peak" Hα*i*–HN*i+2*, en morado las interacciones Hα*i* – HN*i+3* y en verde las Hα*i* – HN*i+4.*

Después de encontrar la secuencia del péptido se procedió a determinar los NOEs de medio rango los cuales definen el tipo de estructura (75) que se determinan de una manera similar a los NOEs de secuencia, en la figura 24 se muestra un ejemplo en líneas de color rojo. Estos NOEs están relacionados con las interacciones espaciales (<5Å) especificas entre el Hα del aminoácido i con el H del grupo amido (HN) de residuos que están localizados dos, tres y cuatro aminoácidos adelante del residuo i en la secuencia peptídica, esto da como resultado interacciones de los siguientes tipos: "cross peak" entre el Hα del residuo *i* con el HN del aminoácido *i+2* (Hα*i*–HN*i+2*), las cuales para nuestro péptido se observan en azul oscuro en la figura 22; interacciones entre Hα del aminoácido i con el HN del *i+3* (Hα*i*–HN*i+3*) (Figura 24, en morado); las del Hα del aminoácido *i* con el HN del residuo *i+4* (Hα*i*–HN*i+4*) (Figura 24, en verde) y las interacciones entre el Hα del residuo *i* con el Hβ del residuo *i+3* (Hα*i*–Hβ*i+3*).

Para este péptido se identificaron esta clase de interacciones o NOEs de medio rango que se resumen en la figura 25 e indican según lo propuesto por Wüthrich (75) que la estructura secundaria preferencial del péptido 33375 es una α-hélice entre los aminoácidos D2 y K19.

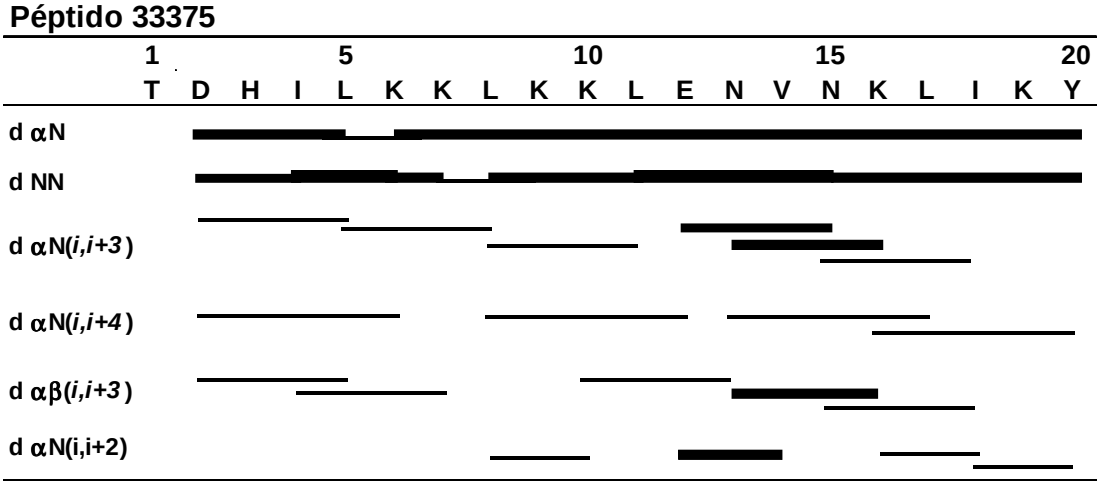


Figura 25. Diagrama de conectividades. Resumen de los NOEs de medio rango para 33375 definiendo una α-hélice. El grosor de las líneas muestra la intensidad de la interacción en el NOESY.

6.3.4.1.1.3. Cálculo de estructura

Se realizó a partir del análisis del espectro NOESY a 295 K y de tiempo de mezcla de 400 ms, del cual se obtuvieron 194 NOES los que fueron convertidos en restricciones de distancia y se dividieron según su intensidad en NOES fuertes que se les asigno un rango de valores de distancia interprotónica entre 1.8 a 2.8 Å, NOEs medianos entre 2.8 a 3.5 Å y NOEs débiles entre 3.5 a 5.0 Å. Para este cálculo se usaron 90 NOEs fuertes, 72 NOEs medianos y 32 NOEs débiles, los cuales forman parte del archivo 33375.rstrnt (Figura 26).

Como se mencionó en la parte de metodología la molécula a la cual se le aplicaron las restricciones determinadas por ^{1}H-RMN como las distancias interprotónicas, se construyó con el módulo “Biopolymer” implementado en el programa Insight II, que después de construida se aplican los potenciales del campo de fuerza y se optimiza la geometría de la molécula (Figura 27), generando los archivos 33374.car y 33375.mdf los que corresponden a la secuencia del péptido analizado en este caso 33375; mediante el programa DGII se generaron las 50 estructuras de partida, las cuales fueron refinadas

usando el protocolo de “simulated annealing, SA” (Anexo 3) de Discover. Adicionalmente, durante el cálculo los enlaces peptídicos fueron forzados a permanecer en conformación trans, se aplicó una distancia de 8 Å como límite de no enlace y de distancia dependiente de la constante dieléctrica (4 x r). Por otro lado, cuando no se pudieron distinguir en el espectro los protones diastereotópicos, se usaron correcciones como pseudoátomos como lo sugiere Wüthrich (75), en este péptido no se utilizaron distancias de enlace de hidrogeno como “constraints” o restricciones debido a que no se adquirieron los espectros TOCSY a diferentes temperaturas.

```
!BIOSYM restraint 1
!
#remote_prochiral_center
!
#chiral
1:THR_1:CA         S
1:THR_1:CB         R
1:ASP_2:CA         S
1:LEU_3:CA         S
1:ILE_4:CA         S
1:ILE_4:CB         S
1:LEU_5:CA         S
1:LYS_6:CA         S
1:LYS_7:CA         S
1:LEU_8:CA         S
1:LYS_9:CA         S
1:LYS_10:CA        S
1:LEU_11:CA        S
1:GLU_12:CA        S
1:ASN_13:CA        S
!
#NOE_distance
1:THR_1:HN  1:THR_1:HA 2.800 3.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00!medium:
1:ASP_2:HN  1:ASP_2:HA 2.800 3.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00!medium:
1:LEU_3:HN  1:LEU_3:HA 1.800 3.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00!strong:
1:ILE_4:HN  1:ILE_4:HA 2.800 3.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00!medium:
1:LEU_5:HN  1:LEU_5:HA 2.800 3.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00!medium:
1:LYS_6:HN  1:LYS_6:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00!strong:
1:LYS_7:HN  1:LYS_7:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00!strong:
1:LEU_8:HN  1:LEU_8:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00!strong:
1:LYS_9:HN  1:LYS_9:HA 1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00!strong:
1:LYS_10:HN 1:LYS_10:HA2.800 3.500 3.500 30.00 30.00 1000.000 0.00!medium:
1:LEU_11:HN 1:LEU_11:HA1.800 2.800 2.800 30.00 30.00 1000.000 0.00!strong:
```

Figura 26. Parte del archivo .rstrnt del péptido 33375, donde se muestran algunos NOEs de distancia

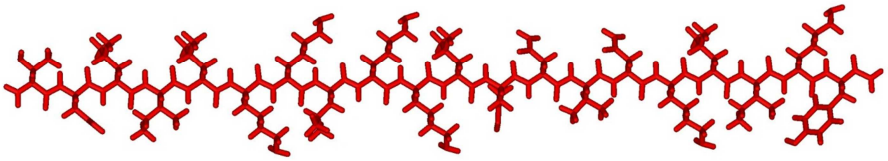


Figura 27. Modelo de conformación extendida del péptido 33375. A este modelo se le aplican los "constraints" obtenidos de ^{1}H-RMN para que adopte la estructura derivada de tales datos.

Después de realizar diferentes cálculos se escogió el mejor resultado dado por el número de estructuras superpuestas y el que mejor se ajustó a los datos experimentales obtenidos del NOESY. Entonces para este péptido de las 50 estructuras resultantes se escogieron 16 estructuras de baja energía que no presentaron violaciones de distancia mayor a 0.3 Å y de ángulo mayor de 2.5º. Al superponer estas estructuras escogiendo la de menor energía como estructura consenso entre los aminoácidos L5-L17 se obtuvo un RMSD promedio de los átomos de la cadena principal igual a 0.45. El resultado de análisis de estructura secundaria usando el algoritmo de Kabsch-Sander (105) mostro que el péptido tiene 3 regiones α-hélice entre H3-K6, L8-E12 y V14-I18 (Figura 28). Sin embargo, por ^{1}H-RMN el péptido tiene una región completa entre D2 a K19, esta pequeña diferencia con lo obtenido en el cálculo de estructura radica en que al analizar los ángulos diedrales φ y ψ de todos los residuos se encontró que los valores de ángulo de K7 y N13 no estaban en el rango permitido (φ=-57±20º y ψ=-47±20º) para esta estructura α-hélice en el diagrama de Ramachandran (105). Sin embargo, se puede afirmar que la estructura preferencial del péptido 33375 está compuesta por las tres regiones α-helicales antes mencionadas.

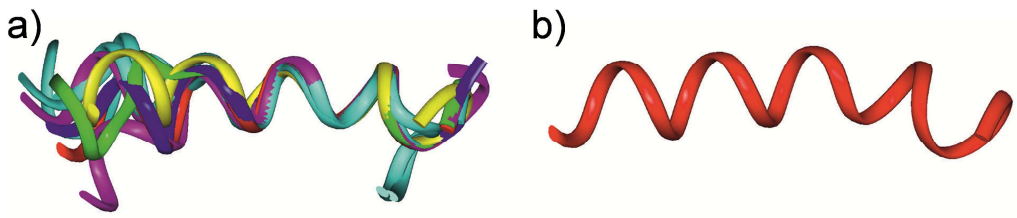


Figura 28. a) Familia de 16 estructuras mostrando el comportamiento α-helical y b) estructura consenso o sea la de menor energía para el péptido 33375.

6.3.4.1.2. Determinación de la estructura de los péptidos modificados 38150 y 38152 derivados del cHABP 33375

6.3.4.1.2.1. Dicroísmo Circular

Los espectros obtenidos por DC para los péptidos **38150** y **38152**, al igual que lo mostrado por su cHABP 33375, muestran los picos de absorción característicos de una α-hélice (Figura 29), una banda de máxima absorción en 190 nm y dos mínimos en 208 y 222 nm.

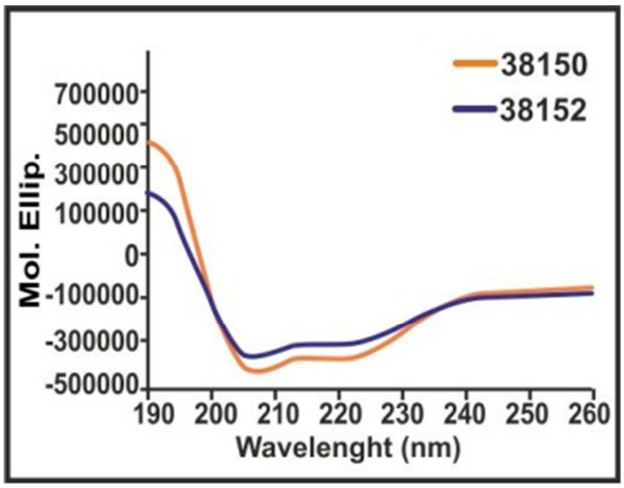


Figura 29. Espectros de DC con sus respectivos mínimos y máximos de absorción de los péptidos modificados **38150** y **38152**.

Sabiendo por DC que su comportamiento estructural es del tipo α-helical, lo que sigue es confirmar su estructura por ^{1}H-RMN y conocer los aminos ácidos implicados en dicha estructura. La determinación de la estructura 3D se realizó de la misma manera como se mencionó anteriormente para el péptido 33375.

Vale la pena aclarar en este momento que solo se pudo realizar el estudio por ^{1}H-RMN al péptido modificado **38152**, ya que el **38150** mostró baja solubilidad y baja estabilidad en el solvente utilizado en el análisis.

6.3.4.1.2.2. 1H-Resonancia Magnética Nuclear del péptido modificado 38152

6.3.4.1.2.2.1. Asignamiento y asignación de NOEs secuenciales y de media distancia

Por medio de los espectros COSY y TOCSY se identificaron los sistemas de espín para cada uno de los aminos ácidos que conforman la cadena peptídica del péptido **38152** y se determinaron los desplazamientos químicos para todos los hidrógenos pertenecientes a los aminoácidos de la secuencia del péptido (Tabla 6).

Con respecto, a los diferentes espectros TOCSY tomados a diferentes temperaturas (285, 295, 305 y 315 K), se observó la dependencia del desplazamiento químico del protón amida con la temperatura ($\Delta\delta HN/\Delta T$), mediante el análisis del coeficiente de temperatura el cual se obtuvo al graficar el desplazamiento químico del HN vs temperatura, este coeficiente proporciono información acerca de la interacción del HN con las moléculas aceptoras de enlace de hidrógeno, un coeficiente de temperatura con valor absoluto bajo (<4.5), indico que el protón HN estaba protegido del solvente, lo que se interpretó como que dicho protón está implicado en un enlace de hidrógeno intramolecular (96) dando indicio de la presencia de estructura secundaria en el péptido, los aminoácidos involucrados en puente de hidrogeno se observan en la figura 30.

Por otro lado, después de analizar el espectro NOESY del péptido **38152**, del mismo modo como se realizó para el péptido 33375 se encontraron NOES secuenciales (Hα*i*-HN*i+1)* de intensidad fuerte y mediana que permitieron encontrar la secuencia del péptido, además se hallaron NOEs de medio rango característicos de una α-hélice entre los residuos D2 a K16, los cuales se observan en la figura 30.

Tabla 6. Desplazamiento químico para el péptido **38152**

Péptido 38152				
AA	**HN**	**Hα**	**Hβ**	**Otros (Hγ, Hδ, Hε)**
T	8,056	4,18	3,98	γ(CH3)=1,21
D	8,590	4,37	2,73; 2,73	
H	8,052	4,40	3,36; 3,31	2H=8,02 4H=7,20
I	7,695	3,79	1,93	γ(CH2)= 1,53; 1,14 γ(CH3)=0,89 δ(CH3)=0,85
L	7,908	4,00	1,48; 1,41	δ(CH3)=0,85; 0,81
K	7,663	3,89	1,81; 1,81	δ(CH2)=1,58; 1,58 γ(CH2)=1,35; 1,35 ε(CH2)=2,89; 2,89
K	7,534	3,97	1,90; 1,90	δ(CH2)=1,64, 1,64 γ(CH2)=1,38;1,38 ε(CH2)=2,88, 2,88
L	8,300	4,02	1,82; 1 ,82	γH=1,60 δ(CH3)=0,83, 0,83
K	8,139	4,09	1,85; 1,85	δ(CH2)=1,60, 1,60 γ(CH2)=1,38;1,38 ε(CH2)=2,92, 2,92
K	7,760	4,08	1,93, 1,93	δ(CH2)=1,67, 1,67 γ(CH2)=1,50;1,41 ε(CH2)=2,92, 2,92
L	8,200	3,99	1,87; 1,87	δ(CH3)=0,85 0,80
Q	8,170	4,09	2,34; 2,12	g(CH2)= 2,49; 2,49
N	7,970	4,69	2,88; 2,79	γNH2=7,45; 6,86
T	7,867	4,25	4,25	γ(CH3)=1,22
N	8,190	4,64	2,80; 2,75	γNH2=7,40; 6,76
K	8,050	4,22	1,87; 1,76	δ(CH2)=1,66, 1,66 γ(CH2)=1,41;1,41 ε(CH2)=2,97, 2,97

Péptido **38152**

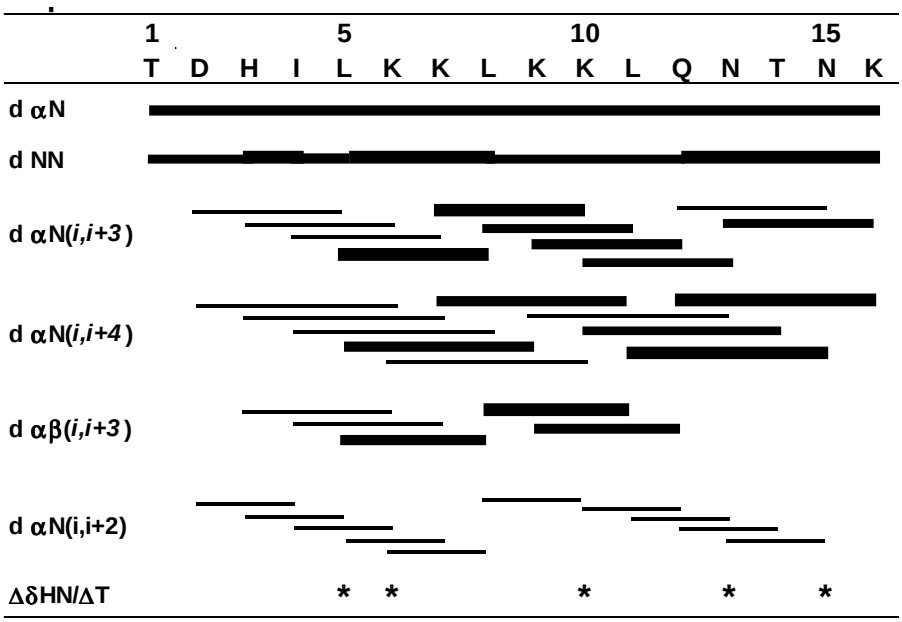


Figura 30. Diagrama de conectividades. Resumen de los NOEs de medio rango para el mHABP **38152** indicando la presencia de una α-hélice. El grosor de las líneas muestra la intensidad de la interacción en el NOESY. * indica los aminoácidos involucrados en enlace de hidrógeno por tener coeficientes de temperatura menores a 4,5.

6.3.4.1.2.3. Cálculo de estructura del péptido modificado 38152

Para este cálculo se utilizaron 207 NOEs los que fueron divididos en 96 NOEs fuertes, 76 NOEs medianos y 35 NOEs débiles, adicionalmente, se incluyeron 5 restricciones relacionadas con los aminoácidos involucrados en enlace de hidrógeno (Figura 30).

Se realizaron diversos cálculos, hasta obtener el final del cual se escogieron 19 estructuras de baja energía que no presentaron violaciones de distancia mayor a 0.35 Å y de ángulo mayor a 3°. De esta familia de estructuras se tomó la de menor energía sobre la cual se superpusieron las otras estructuras entre los aminoácidos 2 al 16 de esta forma se obtuvo un RMSD promedio de los átomos de la cadena principal igual a 0.13, indicando un buen ajuste entre los conformeros seleccionadas en la familia. El resultado del análisis de la estructura secundaria analizando los ángulos phi (Φ) y psi (Ψ) y utilizando el algoritmo de Kabsch-Sander (105) mostró que el péptido es una α-hélice entre D2 a K16 (Figura 31), lo que está de acuerdo con lo encontrado mediante el análisis por ^{1}H-RMN.

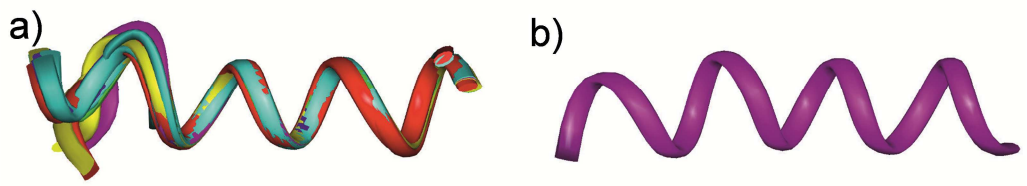


Figura 31. a) Familia de 19 estructuras para el mHABP **38152**. Estructura consenso para el mHABP mostrando una región helical entre D2 a K16.

Para finalizar, con los estudios realizados de la determinación de la estructura de los péptidos derivados de la proteína SPECT-1, en la tabla 7 se resumen los resultados que muestran que los péptidos analizados son α-hélices.

Tabla 7. Resumen de estructura para los péptidos de SPECT-1

Péptido	DC	RMN	Cálculo
33372	Hélice	ND	ND
33374	Hélice	ND	ND
33375	Hélice	Hélice (D2-Y20)	Hélice (L8-I18)
38150	Hélice	ND	ND
38152	Hélice	Hélice (D2-K16)	Hélice (D2-K16)

6.3.4.2. Proteína SPECT-2

6.3.4.2.1. Determinación estructural de los cHABPs 34925, 34935, 34936, 34938, 34939, 34941, 34946, 34949, 34951, 34957 y 34959

6.3.4.2.1.1. Dicroísmo Circular

En la figura 1C2 del anexo 1, se observan los espectros de DC para los cHABPs 34925, 34935, 34936, 34939, 34941, 34946, 34949, 34951, 34957 y 34959; los cuales muestran un máximo de absorción alrededor de 190nm y dos mínimos de absorción cercanos a 208 y 222nm, estas bandas indican el comportamiento α-helical de estos péptidos, resultados que están de acuerdo con el análisis de los datos (para cada cHABP) mediante el uso de algoritmos de deconvolución como: Continll, SELCON3 y CDSSTR (106), los que indican un alto contenido de estructura del tipo α-hélice en estos péptidos.

Por otro lado, se encuentran los cHABPs 34938, 34953, 34958 y 34960 que mostraron una banda de absorción intensa alrededor de 200nm (Figura 1C3, anexo 1), lo que indica la presencia de regiones no estructuradas en estos péptidos o en otras palabras su comportamiento “random coil”.

6.3.4.2.1.2. ^{1}H-Resonancia Magnética Nuclear

A pesar de la presencia de regiones estructuradas en 10 de los 14 cHABPs derivados de SPECT-2 (Figura 1C2, anexo 1), solo se escogieron cinco cHABPs a los cuales se les determinó su estructura por ^{1}H-RMN el 34936, 34938, 34941, 34949 y 34951, los que están presentes en el dominio MACPF de la proteína, adicionalmente fueron solubles y estables en las condiciones en las cuales se llevaron a cabo los experimentos.

Asignamiento y asignación de NOEs secuenciales y de media distancia

Mediante el análisis de los espectros COSY y TOCSY fue posible determinar tanto el sistema de spin de cada aminoácido como el desplazamiento químico de cada hidrógeno presente en la cadena peptídica de todos los cHABPs.

El estudio de los espectros TOCSY tomados a diferentes temperaturas, más exactamente el coeficiente de temperatura, sugirió que los cHABPs 34936, 34941, 34949 y 34951 tienen aminoácidos involucrados en enlace de hidrógeno, los cuales se muestran en la figura 32 y dan un indicio de la presencia de regiones estructuradas en estas moléculas, como se esperaba por lo visto en los espectros de DC.

A continuación, se realizó el análisis de los espectros NOESY de cada uno de los cHABPs, en primer lugar se halló la secuencia de ellos, gracias a la presencia de los NOES fuertes y medios del tipo Hα*i*–HN*i+1*, después, se encontraron las interacciones entre los hidrógenos debidos a efectos dipolares (a través del espacio), o sea, los NOEs de medio rango del tipo (Hα*i*–HN*i+2*), (Hα*i*–HN*i+3*), (Hα*i*–HN*i+4*) y (Hα*i*–Hβ*i+3*) (Figura 32), los cuales estuvieron presentes en los cHABPs 34936, 34941, 34949 y 34951, lo que sugirió la presencia de estructura secundaria del tipo α-hélice en estos cHABPs; mientras que el 34938 no mostro ningún NOE de esta naturaleza, lo que indica que su conformación es totalmente extendida (75), lo que está de acuerdo con lo encontrado por DC.

Entonces, el 34936 mostro tres fragmentos α-helicales cortos entre los aminoácidos K3-I6, D9-T12 y V16-W19, mientras que 34941 y 34951 mostraron una sola región α-hélice entre T4-P15 y K2-S18, respectivamente, además se observa una región flexible hacia el amino y carboxi terminal para el 34941. Por otro lado, para el 34949 se sugirió la presencia de una α-hélice distorsionada entre S6 y F9, debido a la presencia de los NOEs correspondientes a (Hα*i*–HN*i+2*), (Hα*i*–HN*i+3*), (Hα*i*–HN*i+4*) pero no la existencia de NOEs del tipo (Hα*i*–Hβ*i+3*) los cuales son importantes para definir una α-hélice (75, 96), además, como no se encontraron correlaciones de hidrógenos acoplados espacialmente hacia el amino y carboxi terminal de este péptido, se sugiere que estas regiones son no estructuradas ("random coil").

6.3.4.2.1.3. Cálculo de estructura

Para el análisis estructural de los péptidos 34936, 34941, 34949 y 34951, los "constraints" de distancia interprotónica fueron derivados de sus respectivos espectros NOESY de 400 msec.

Para obtener el modelo estructural de los péptidos fue necesario correr varios cálculos generando 50 estructuras para cada uno; en el cálculo final se escogieron las familias de estructuras que mejor satisfacían los "constraints" y el elemento estructural derivado de los datos de ^{1}H-RMN, del mismo modo, que fueran estructuras de baja energía y que no mostraran violación de ángulo diedral mayor de 3º ni de distancia mayor de 0.35 Å. Además que la superposición del backbone de la parte estructurada tuviera un valor de RMSD bajo y que los ángulos φ y ψ estuvieran alrededor de -57º y -47º respectivamente, en las regiones helicales, lo que confirma la presencia de esta clase de estructura secundaria en los péptidos.

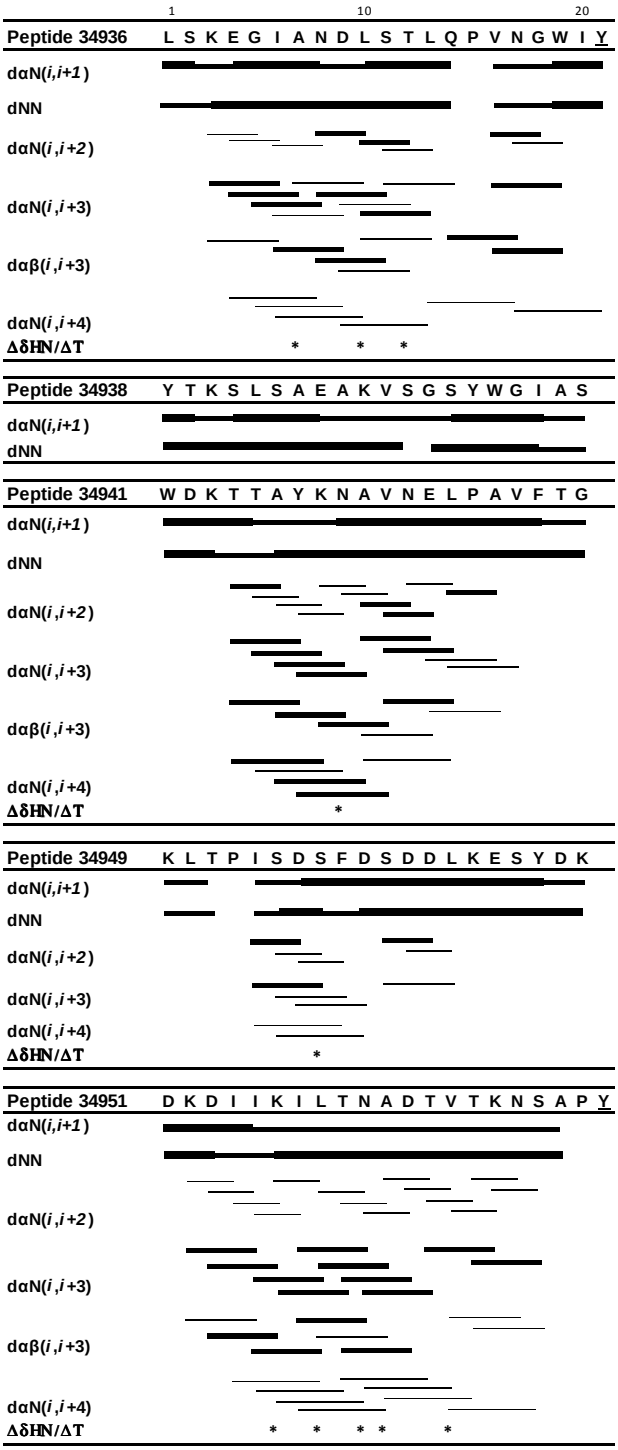


Figura 32. Diagrama de conectividades para los cHABPs derivados de SPECT-2, donde se muestra la tendencia α-helical excepto para el 34938. El grosor de las líneas indica la intensidad del NOE. * indica los aminoácidos involucrados en enlace de hidrógeno.

El resultado del cálculo de estructura para estos cHABPs se encuentra depositado en la siguiente tabla.

Tabla 8. Resultado del cálculo de estructura para los cHABPs derivados de SPECT-2

Péptido	Características estructurales	NOEs iniciales	Familia confor.	Superposición	RMSD	Máx. Viol. de NOE (Å)	Máx. Viol. de ángulo
34936	α-hélice; K3-I6, D9-T12,V16-W19	198	19	E4 -I19	0,44	0,35	2,5
34941	α-hélice; A6-E13	173	29	T4-L14	0,18	0,3	3,0
34949	α-hélice distorcionada; S6-F9	152	19	S6-F9	0,2	0,3	2,5
34951	α-hélice; K2-S18	185	21	K2 -S18	0,25	0,3	2,0

NOEs iniciales: Número de NOEs con los que se inició el cálculo de la estructura; **Familia confor**: Familia de conformeros escogidos; **Superposición**: Región en la cual se superpusieron las estructuras seleccionadas; **Máx. Viol. de NOE (Å)**: Máxima violación de NOE (Å); **Máx. Viol. de ángulo**: Máxima violación de ángulo en grados.

Las regiones α-hélice, los extremos amino y carboxi terminal flexibles obtenidas mediante el cálculo de estructura para los cHABPs, estuvieron de acuerdo con lo encontrado por ^{1}H-RMN, lo que indica que la estructura obtenida es la preferencial de dichos péptidos (Tabla 8, Figura 33). Sin embargo, para el 34941 se observa una ligera diferencia entre el modelo cuya región helical está entre A6 y E13 y los NOEs observados por ^{1}H-RMN indican que esta hélice va de T4 a P15, la explicación es que cuando se analizaron los ángulos φ y ψ de T4, T5, L14 y P15, no se encuentran en el rango permitido en el plot de Ramachandran (107) para esta estructura secundaria, por tal motivo el análisis por Kabsch y Sanders (105) no incluye estos aminoácidos en la región α-helical, pero observando el modelo obtenido se ve la tendencia helical desde T4 hasta P15.

.

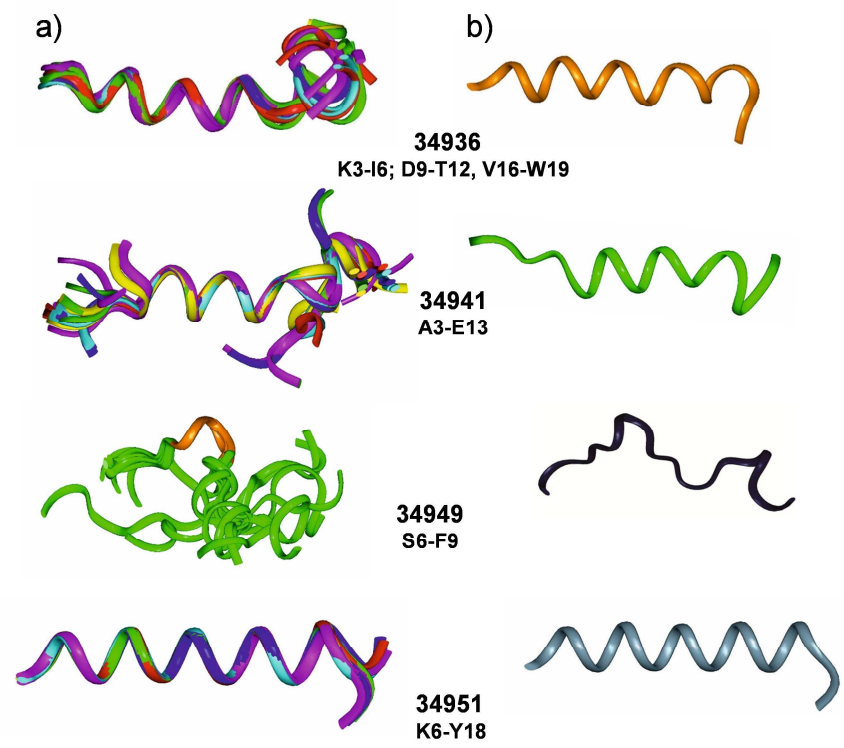


Figura 33. a) Familia de estructuras seleccionadas para los cHABPs 34936, 34941, 34949 y 34951 mostrando su comportamiento α helical y b) estructura consenso de cada uno de los péptidos.

6.3.4.2.2. Determinación de la estructura de los péptidos modificados derivados de los cHABPs 34935, 34936, 34938, 34941, 34949, 34951 pertenecientes a SPECT-2

6.3.4.2.2.1. Dicroísmo Circular

Los espectros de DC de los mHABPs **38098** derivado del cHABP 34935; **38890**, **38892** y **38962** provenientes de 34938; **38092** y **38094** de 34941, tomados en TFE/H2O (30/70 %v/v) mostraron una clara y marcada banda positiva, con un máximo a 190 nm y dos bandas negativas con mínimos a 222 y 208-209 nm (Tabla 9), lo que sugiere un alto contenido de α-hélices en estos péptidos (Figura 34).

Mientras que **38972** y **38974** de 34936; **38114** de 34949, mostraron una elipticidad molar menor a cero con un mínimo intenso entre 199 y 202 nm (Tabla 7), indicativo de regiones no estructuradas en estos mHABPs (Figura 34), lo que se confirma con los datos de deconvolución por los métodos SELCON3, CONTINLL y CDSSTR que sugieren que estas moléculas tienen entre un 85 y 95% de regiones “random coil”. Para el **38128** de 34949 se observan un mínimo intenso en 202 (Figura 34), lo que sugiere la presencia de una

estructura del tipo hélice poliprolina-II de mano izquierda ($PPII_L$, por sus siglas en ingles), además, al analizar los datos de deconvolución obtenidos por los métodos SELCON3, CONTINLL y CDSSTR, se puede inferir que este péptido también presenta una región de α-hélice corta, entonces se sugiere que este péptido modificado (**38128**) tiene una región α-helical corta precedida o seguida por una estructura hélice-$PPII_L$. Por otro lado, está el comportamiento del mHABP **38118** derivado de 34951 que presenta un máximo en 190 nm poco intenso y dos mínimos en 226 y 204 nm (Tabla 9, Figura 34), la deconvolución por los métodos SELCON3 y CDSSTR no es muy clara porque los valores que se observan respecto al contenido estructural es muy similar tanto para α-hélice como para estructuras desordenadas, lo que sugiere que el péptido muestra una región con tendencia helical y la otra región debe ser flexible (Figura 34).

Finalmente, para los mHABPs **38090**, **38100**, **38116**, **38120**, **38124**, **38130**, **38888**, **38958** y **38960** (Tabla 7), fue imposible obtener los espectros DC debido a su insolubilidad en las condiciones del experimento.

Tabla 9. Resultados de dicroísmo circular para péptidos modificados derivados de cHABPs de la proteína SPECT-2.

cHABP	mHABP	Max. Absorción (nm)	Min. Absorción (nm)	Estructura secundaria
34935	**38098**	190	222; 209	α-Hélice
	38100		insoluble	ND
	38130		insoluble	ND
34936	**38972**		199	random
	38974		199	random
34938	**38890**			α-Hélice
	38892	190	222; 208	α-Hélice
	38962			α-Hélice
34941	**38090**		insoluble	ND
	38092	190	222; 209	α-Hélice
	38094			α-Hélice
	38120		insoluble	ND
34949	**38114**		199	random
	38128		202	Tendencia helical/ $PPII_L$
	38888		insoluble	ND
	38958		insoluble	ND
	38960		insoluble	ND
34951	**38116**		insoluble	ND
	38118	190	226; 203	Tendencia helical
	38124		insoluble	ND

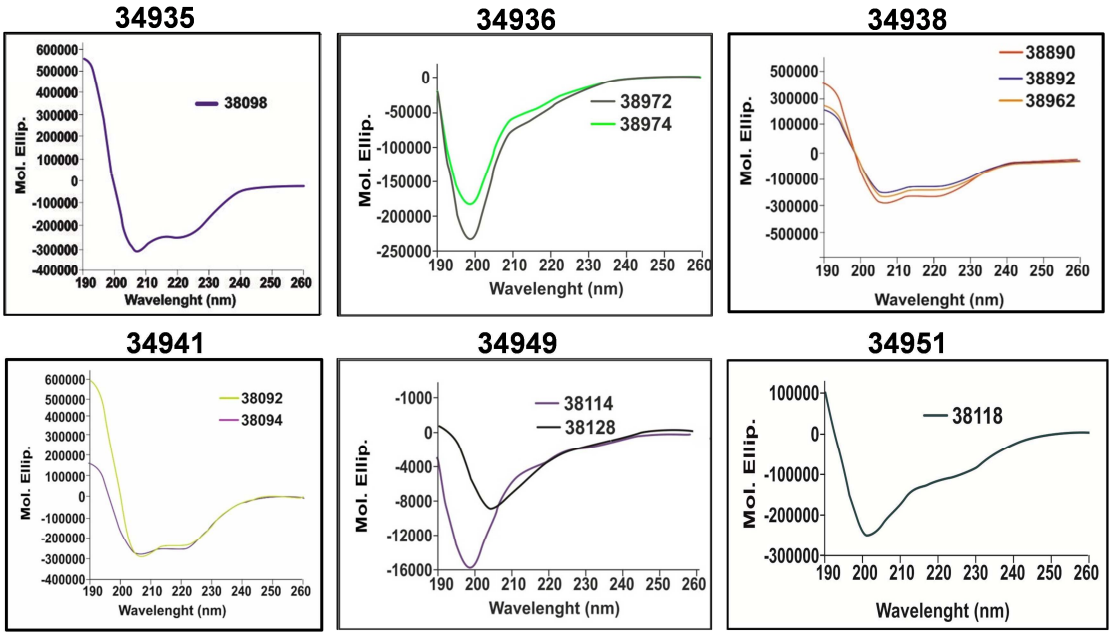


Figura 34. Espectros de DC con sus respectivos mínimos y máximos de absorción de los péptidos modificados derivados del 34935, 34936, 34938, 34941,34949 y 34951 de SPECT-2.

6.3.4.2.2.2. ^{1}H-Resonancia Magnética Nuclear

Se realizó la determinación de la estructura por ^{1}H-RMN de los péptidos modificados **38092** y **38094** derivados de 34941, los cuales son α-helicales por DC.

De los otros péptidos analizados por DC no se realizó ^{1}H-RMN debido a su marcada insolubilidad en las concentraciones requeridas para este análisis.

Asignamiento y asignación de NOEs secuenciales y de media distancia

El análisis de los espectros COSY y TOCSY permitió determinar el sistema de spin de cada aminoácido y el desplazamiento químico de cada hidrogeno presente en la cadena peptídica para los dos péptidos.

En la interpretación de los espectros NOESY se encontraron NOES (Hα*i*–HN*i*+*1*) que permitieron hallar la secuencia de cada uno de los péptidos. También se encontraron señales debidas a la interacción de hidrógenos que se encuentran lejanos en secuencia pero cercanos en el espacio, o sea, NOEs de medio rango que definen estructura [(Hα*i*–HN*i*+*2*), (Hα*i*–HN*i*+*3*), (Hα*i*–HN*i*+*4*) y (Hα*i*–Hβ*i*+*3*)], lo que sugirió la presencia de una α-hélice (75) entre los residuos D2 y T19 para el **38092** y entre K3 y V17 para **38094** (Figura 35).

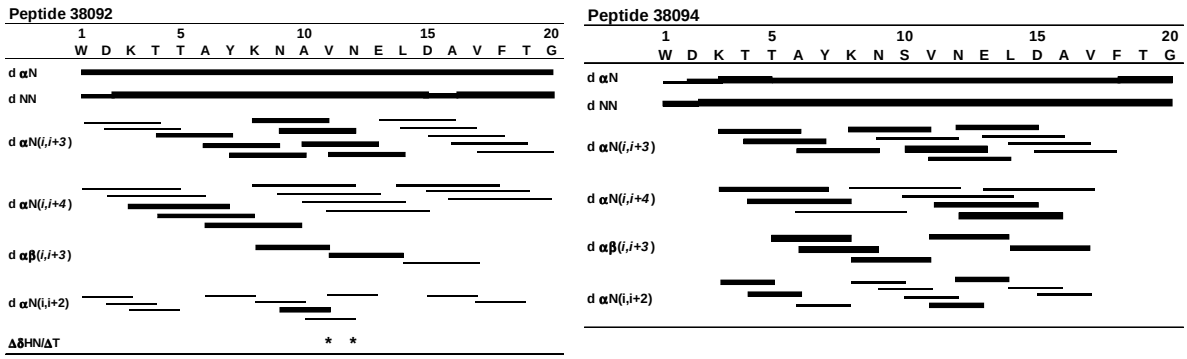


Figura 35. Diagrama de conectividades para **38092** y **38094** derivados de 34941 (SPECT-2), donde se observa el comportamiento α-helical. El grosor de las líneas indica la intensidad del NOE. * indica los aminoácidos que mostraron coeficientes de temperatura menores a 5,0 y por tanto involucrados en enlace de hidrógeno.

6.3.4.2.2.3. Cálculo de estructura

En la obtención del modelo estructural los datos fueron derivados de sus correspondientes espectros NOESY (400ms de mixing time), al igual que en los casos anteriores, se escogieron las estructuras que cumplieron con los "constraints" y la estructura obtenida de los datos de ^{1}H-RMN. Se escogieron las estructuras que no presentaron violaciones mayores de ángulo diedral mayor de 3º ni de distancia mayor de 0.3 Aº, que la superposición de los átomos de la cadena principal tuvieran un valor bajo de RMSD (Tabla 10), el cual indica el gran parecido de las estructuras seleccionadas en cada familia.

Para el péptido **38092** el modelo aceptado muestra que tiene una α-hélice entre los residuos D2 y F18 (Figura 33), lo cual está ligeramente en desacuerdo con el análisis por ^{1}H-RMN que sugirió una región α-helical entre D2 y T19. El análisis de los valores de φ=-155° y ψ= 77° para la T19 muestra que están fuera del rango permitido para los ángulos diedrales en una α-hélice (φ=-57° ± 15° y ψ=-47° ± 15°), razón por la cual se excluye de la región helical en el modelo estructural, aunque T19 esté involucrada en los NOES que definen estructura.

Lo mismo sucede con el modelo obtenido para el péptido **38094** que mostró una α-hélice entre los residuos K7 y D15 (Figura 36), y por ^{1}H-RMN la α-hélice está localizada entre K3 y V17; los aminoácidos K3, T4, T5, A16 y V17 que no se incluyeron en el modelo tienen un valor de ángulo φ y ψ que están fuera del rango permitido en una α-hélice, a pesar de estar implicados en NOEs de medio rango, entonces lo que se puede inferir es que la

estructura más favorecida de este péptido es una α-hélice que comprende los aminoácidos K7 a D15 y una tendencia helical hacia el amino y carboxi terminal (Figura 33).

Tabla 10. Resultados del cálculo de estructura para **38092** y **38094**

Péptido	Características estructurales	NOEs iniciales	Familia confor.	Superposición	RMSD	Máx. Viol. de NOE (Å)	Máx. Viol. de ángulo
38092	α-hélice; D2-F18	197	17	D2 -F18	0,14	0,3	2,5
38094	α-hélice; Y7-D15	198	29	K3-V17	0,13	0,3	2,0

Familia confor: Número de estructuras seleccionadas en la familia

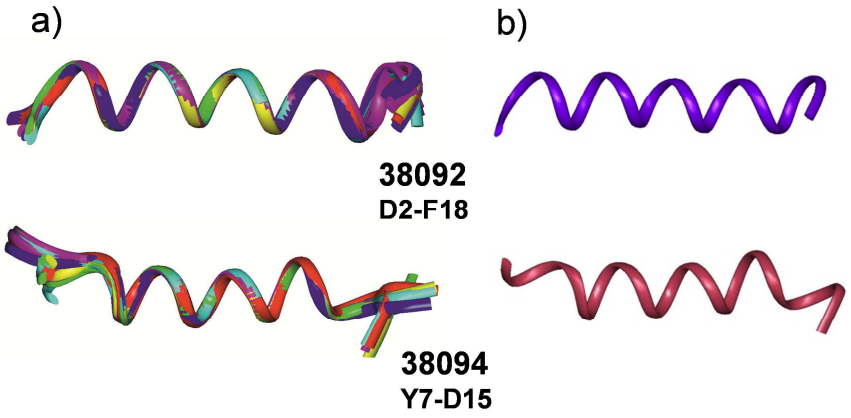


Figura 36. a) Familia de conformeros seleccionados para **38092** y **38094** mostrando su región de α-hélice, b) estructura consenso de cada uno de los péptidos.

6.3.5. Estudios Estructurales

En cuanto a SPECT-1, al analizar la cavidad de ~750 $Å^3$ que tiene la estructura 3D de esta proteína, la cual está relacionada con la unión de un ligando (posiblemente colesterol) y que está conformada por aminoácidos hidrofóbicos entre los que se encuentran A81, S82, D89, V90, V91, L94, Y97 (100) los que coinciden con la ubicación del cHABP 33372. Cuando se hace el alineamiento de la secuencia de SPECT-1 y los cHABPs, las posiciones correspondientes a N156 y K160 que pertenecen al cHABP 33375, y el residuo S98 de 33372 forman parte un bolsillo profundo que se encuentra en yuxtaposición a la cavidad y que aún no se sabe que ligando puede unir (100). La

localización de los cHABPs 33372 (rojo) y 33375 (morado) en esta cavidad (Figura 37) sugiere que ellos podrían estar involucrados en la unión de SPECT-1 a moléculas como el colesterol, siendo estos péptidos parte importante en la función que cumple la proteína.

Por otro lado, se encuentran interacciones del tipo enlace de hidrógeno en los que participan los aminoácidos N143HN, F144HN, I145HN y C142HN del cHABP 33374 con K139O, N140O, V141O y I138O de 33375 los cuales ayudan a estabilizar las hélices que forman parte de la cavidad de la estructura 3D de SPECT-1, sugiriendo que estos tres cHABPs deben ser importantes para el parásito en el momento de la unión a la célula hospedera.

Adicionalmente, se observan regiones helicales en la estructura 3D de SPECT-1 en las que las zonas donde se localizan los cHABPs 33372, 33374 y 33375 los cuales por DC también son hélices. Como se tiene la estructura 3D del cHABP33375 por ^{1}H-RMN y cálculo de estructura, entonces se superpuso sobre la estructura 3D de SPECT-1 con el objetivo de conocer que parecido estructural tiene el péptido con su región correspondiente en la proteína y se encontró que el valor de RMSD es de 2.16 sugiriendo que estos dos fragmentos son estructuralmente similares (Figura 37), lo cual es considerado importante, como fue demostrado por Patarroyo y colaboradores (3), esta similitud es clave debido a que los péptidos podrían llevar a cabo o estar involucrados en funciones similares a las que cumplen las regiones de la proteína donde los péptidos se encuentran localizados, funciones como unión a las células hospederas, actividad enzimática, interacción proteína-proteína o receptor ligando (3), en el caso de SPECT-1 podría ser importante en el reconocimiento de la molécula de colesterol.

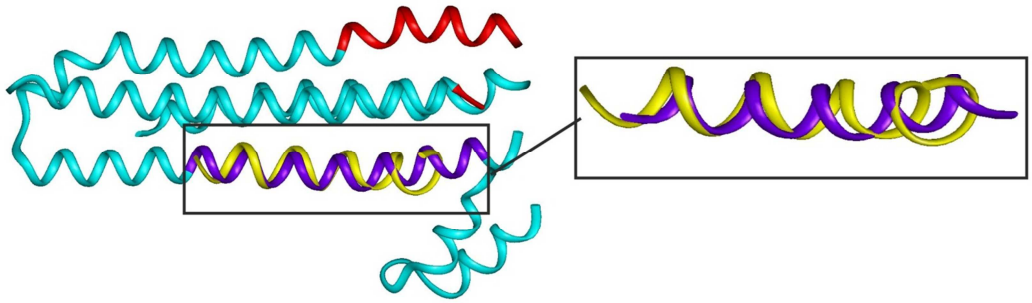


Figura 37. Superposición del péptido 33375 en amarillo con su correspondiente región (morado) en la estructura 3D de SPECT-1 (código PDB: 4U5A), en rojo se muestra el cHABP 33372.

Respecto a la proteína SPECT-2 que tiene el dominio MACPF el cual es conservado en muchos reinos de la vida, como por ejemplo, en los vertebrados el cual está presente en

cinco de los complejos de ataque a la membrana del complemento (C6, C7, C8α, C8β y C9); también los parásitos del género apicomplexa poseen este dominio el cual interactúa con diferentes tipos de células del hospedero (31). En los *Plasmodium* se encuentran 5 genes que codifican para el dominio MACPF presentes en *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. yoelli*, *P. berghei* y *P. chabaudi*, estos genes codifican para el mismo número de proteínas llamadas PPLP1 a PPLP5 (*Plasmodium* perforin-like protein) (31). Las características estructurales de este dominio son conservadas y poseen un conjunto de cuatro hebras-β en la región central, rodeado de dos grupos de α-hélices y β-turn (31) que definen diferentes dominios los cuales están involucrados en diferentes funciones como la unión a membrana (dominio 4, D4), inserción de la membrana y formación del poro (D1, D2, D3) (108) (Figura 1D, panel derecho, anexo 1). Adicionalmente, este dominio MACPF en las proteínas muestra una limitada similaridad en secuencia pero comparten una serie de aminoácidos particular, similar a una huella digital que contiene los residuos Y/WGT/SHFxxxxxxGG (31) y motivos KN.

Conociendo que SPECT-2 o PPLP1 contiene en su región central el dominio MACPF se realizó un alineamiento (Anexo 4) de la secuencia de esta proteína con la secuencia del dominio MACPF de la proteína del complemento C8α (la cual es estructural y funcionalmente muy similar a la familia de toxinas formadoras de poros, llamadas citolisinas dependientes de colesterol o CDC (109)), encontrándose que SPECT-2 muestra similaridad a nivel de secuencia de aminoácidos con C8α-MACPF, al igual que presenta elementos estructurales similares, cuando se compara o se superpone la estructura obtenida por DC (Figura 1C2 y C3, anexo 1) o por ^{1}H-RMN de nuestros cHABPs sobre la estructura 3D obtenida por cristalografía de rayos X de C8α-MACPF (108) (Figura 2D, anexo 1), lo que se describe en detalle a continuación.

El fragmento en C8α-MACPF correspondiente al cHABP 34938 ubicado en D1 (dominio 1) (Figura 38 o Figura 2D, azul oscuro, anexo 1) mostro una estructura extendida al igual que lo determinado por DC; algo similar sucedió con 34939 (Figura 38 o Figura 2D, café, anexo 1) que presenta una región de α-hélice por el análisis de deconvolución de los datos obtenidos por DC y que se encuentra localizado al inicio de la región rica en hebras-β de MACPF que se correlaciona con los elementos estructurales determinados para C8α-MACPF, desafortunadamente para el cHABP 34946 el cual también está localizado en esta región, su estructura 3D no fue elucidada por cristalografía de rayos X.

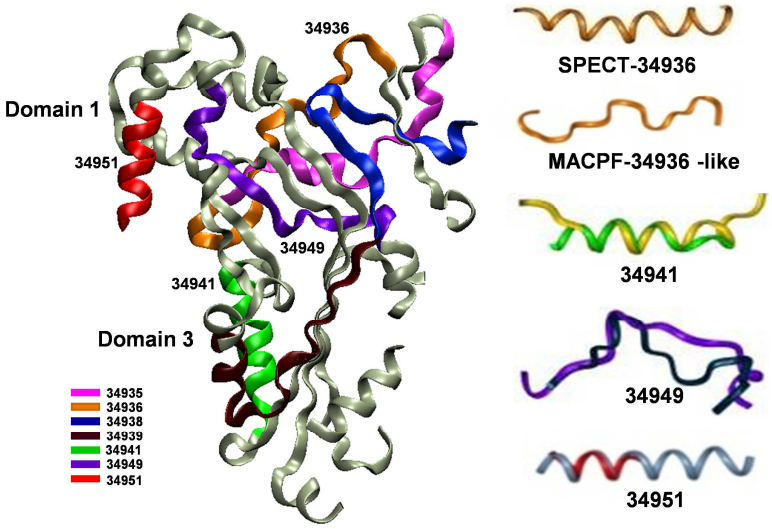


Figura 38. Estructura 3D del dominio MACPF perteneciente a C8α (código de acceso en el PDB: 2QQH) en el cual se muestran en el panel izquierdo en colores la ubicación teórica de los cHABPs 34935, 34936, 34938, 34939, 34941, 34949 y 34951 derivados de SPECT-2, y en el panel derecho la superposición de la estructura 3D de los cHABPs (determinada por ^{1}H-RMN) sobre C8α-MACPF.

Con respecto al cHABP 34941 (Figura 38 o Figura 2D, amarillo, anexo 1, panel derecho) que tiene una α-hélice (A6-E13) y el 34951 (Figura 38 o Figura 2D, gris, anexo 1, panel izquierdo) cuya α-hélice abarca los residuos K2 a S18, se observa que cuando la estructura 3D de los cHABPs se superpone con sus correspondientes fragmentos en C8α-MACPF tienen un valor de RMSD de 0.81 (Figura 38 o Figura 2D, verde, anexo 1) y 0.52 (Figura 38 o Figura 2D, rojo, anexo 1), respectivamente; estos valores bajos de RMSD indican su alto grado de similitud estructural con sus respectivas regiones en C8α-MACPF; interesantemente el 34941 se ubica en la región involucrada con la inserción y formación de poros sobre la membrana (108).

Por el contrario, se encontró un valor alto de RMSD de 4,5 para el 34949 localizado en el dominio 1 (D1) de C8α-MACPF (Figura 38 o Figura 2D, azul oscuro, anexo 1, panel izquierdo) el cual muestra una estructura desordenada, mientras que la estructura 3D determinada por ^{1}H-RMN para el cHABP 34949 es una α-hélice corta distorsionada entre S6 y F9, lo que indica que 34949 tiene un comportamiento similar mas no idéntico a su fragmento análogo en C8α-MACPF.

También se observan algunas diferencias estructurales en los cHABPs 34935 (helical por DC) y 34936 (α-hélice entre K3-I6, D9-T12 y V6-W19, por ^{1}H-RMN) con las estructuras desordenadas que muestran estos fragmentos en C8α-MACPF.

Por otro lado, los cHABPs 34941 y 34951 contienen el motivo KN (Figura 1B, anexo 1, resaltado con cajas azules), el cual es una secuencia putativa de unión a moléculas que contienen sulfato descrito para CDCs (110), lo cual posiblemente puede ser asociado a la interacción de SPECT-2 con proteoglicanos altamente sulfatados como receptores de sulfato de condroitina y dermatan sulfato ubicados sobre la superficie de las células hospederas. Lo que se corroboro por el efecto del tratamiento enzimático de la unión de los cHABPs a las células HeLa (Tabla 1, anexo 1), unión que fue sensible a la enzima CACB que está relacionada con el clivaje de moléculas que contienen sulfato de condroitina y dermatan sulfato (69).

La similaridad en secuencia (13% de identidad y 30% de similaridad), así como la alta similitud a nivel de estructura secundaria, permite sugerir que el dominio MACPF de SPECT-2 tiene una estructura tridimensional similar a la de sus dominios homólogos C8α y CDC proteínas de formación de poros sobre la membrana, lo que puede ser asociado con la formación de poros y el paso a través de las células (“cell-traversal”) funciones previamente reportadas para este dominio en SPECT-2 (97), lo que permite proponer, que algunos de nuestros cHABPs están mediando funciones relacionadas con la unión y formación de poros sobre la membrana de las células hospederas.

Otro hallazgo importante es que los cHABPs 34938 y 34936 forman un enlace de hidrógeno entre la tirosina ubicada en la posición 335 (Y335) de 34938 con la tirosina en la posición 301 (Y301) de 34936 (Figure 1E, anexo 6) para generar una cavidad, donde posiblemente un receptor aún no identificado debe unirse para mediar la función de SPECT-2 en el paso a través de las células (108) el cual es clave para la infectividad del *Plasmodium*.

Adicionalmente, un estudio realizado por Baran y colaboradores en 2009 en el cual ellos encontraron que aminoácidos ubicados estratégicamente en la secuencia de C8α-MACPF como D191, R213 y E343 contribuyen en la oligomerización de la perforina mediante la formación de puentes salino como sucede entre R213 y E343 (111). Analizando el

alineamiento de la secuencia de SPECT-2 con C8α-MACPF, se encontró que hay un ácido aspártico localizado en una de dichas posiciones (E343) que corresponde en la secuencia de SPECT-2 a la posición 552 (D552) la cual pertenece al cHABP 34949, entonces gracias a este estudio se puede proponer que el D552 (34949) (Figure 1F, anexo 6) debido a su ubicación y carga negativa le permite formar un puente salino con un aminoácido de carga positiva ubicado en la cara opuesta de D3 (dominio 3), para ayudar en el proceso de oligomerización de la perforina lo cual es importante para que SPECT-2 cumpla su función.

Por otra parte, se ha encontrado que algunos cHABPs están formando enlaces de hidrógeno entre ellos, ayudando a las proteínas a cumplir con su función, como ejemplo de esta característica tenemos: el 1783 que mediante la formación de enlaces de hidrógeno ayuda a la dimerización de la proteína EBA (112), el enlace de hidrógeno entre 6746 y 6754 de SERA formando una triada enzimática no canónica (113), los puentes de hidrógeno entre los cHABPs 4313 y 4325 derivados de AMA-1 que colaboran para la formación de un canal en el que se une un receptor aún desconocido que están involucradas con diferentes funciones como la unión e invasión a las células hospederas (113, 114), otros cHABPs están localizados en sitios de adhesión a metales como el 3287 y 3289 de TRAP y en sitios claves para el reconocimiento de proteoglicanos altamente sulfatados como el 3279 y 3277 también de TRAP (112), o como en el caso de SPECT-2, el enlace de hidrógeno se encontró entre 34936 y 34938 localizados en el dominio MACPF (Figura 1E, anexo 6), sugiriendo que están involucrados en la función que cumple esta proteína.

Lo anterior, muestra que la invasión del esporozoíto y el merozoíto de *P. falciparum* a las células hospederas, obliga al parásito a crear un nicho, un canal o una cavidad formada por uno o dos cHABPs que se localizan en diferentes regiones de la molécula o dominios para la unión a los receptores en las células huésped (112). Estos cHABPs, debido a su función crítica durante la infección, no pueden mostrar variaciones en sus secuencias de aminoácidos o en su estructura 3D, por lo tanto, son inmunológicamente silenciosos haciéndolos el talón de Aquiles del parásito de la malaria. Un análisis más completo acerca de lo anterior se puede leer en el anexo 6, un artículo publicado por nosotros este año y que aporta al conocimiento del parásito, lo que permite avanzar en el diseño racional de vacunas eficaces químicamente sintetizadas, multi-epitope y multi-estadio.

Por lo tanto, el hecho de que los péptidos de SPECT-1 y 2 formen parte de estas cavidades o canales y además de la formación de enlaces de hidrógeno entre algunos de ellos como se mencionó, sugiere que el análisis estructural que se realizó para estos cHABPs es adecuado y que definitivamente estos péptidos si están involucrados en la formación de poros, para que estas proteínas cumplan su función relacionada con el paso del parásito a través de las células y que el esporozoíto llegue a las células del hígado.

6.3.6. Estudios inmunológicos y Relación estructura-función

Se realizaron tres inmunizaciones en monos *Aotus* con los péptidos poliméricos modificados de los cHABPs 33375 de SPECT-1; 34935, 34936, 34938, 34941, 34949 y 34951 de SPECT-2, cuyas secuencias se observan en las tablas 3 y 4, respectivamente; se tomaron muestras de sangre en días específicos (esquema de inmunización y sangría ver sección materiales y métodos) y la producción de anticuerpos fue evaluada mediante IFI. Vale la pena mencionar que los péptidos conservados cHABPs no fueron inoculados en el modelo animal debido a que se sabe que son no inmunogénicos (3).
Para el análisis de la relación entre la estructura y el comportamiento inmunológico de los péptidos conservados y los péptidos modificados se tienen en cuenta las características estructurales de cada uno de los péptidos y los resultados de inmunogenicidad.

Para SPECT-1 se observa en la tabla 9 que el mHABP **38150** indujo anticuerpos en el mono *Aotus* mientras que los péptidos 33375 y el **38152** no lo hicieron. Estos tres péptidos mostraron una región α-helical determinada por DC, la cual fue confirmada para los péptidos **38152** y 33375 por ^{1}H-RMN. Desafortunadamente por problemas de solubilidad no fue posible obtener el modelo estructural de **38150**, lo que no permite comparar las regiones α-helicales en los tres péptidos con su actividad inmunológica; sin embargo, para solucionar este inconveniente se realizó el análisis de los datos de deconvolución obtenidos por DC para estos péptidos.
Lo que se observa por SELCON3 y CDSSTR es que el contenido α-helical es relativamente más bajo en **38150** (0,614 y 0,380) que en **38152** (0,618 y 0,461) y que en el cHABP 33375, por lo tanto, se puede especular, que la α-hélice puede ser más corta en **38150** y por la tanto, será más flexible en alguna(s) región(es) de su secuencia. El posible acortamiento de la región helical en **38150** puede presentarse por los cambios realizados en algunos de sus aminoácidos (Tabla 11), ya que algunas de estas modificaciones como K9G no favorece la formación de la α-hélice (115). Además se observa que el 33375 y el

mHABP **38152** los cuales son no inmunogénicos tienen una región helical que abarca la totalidad de su secuencia peptídica, posiblemente la razón por la cual no hubo producción de anticuerpos en **38152**, se debe a que su alto grado estructural no le permite tener la distancia apropiada entre el aminoácido que ajusta en el "pocket" 1" y el que ajusta en el "pocket" 9 de la región de unión del péptido (PBR, siglas en ingles de peptide binding region) del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II) (3, 116).

Tabla 11. Secuencias, títulos de anticuerpos obtenidos por IFI y estructura obtenida por DC o por ^{1}H-RMN del cHABP 33375 y sus mHABPs **38150** y **38152**

Péptido	Secuencia	Ac III_{80}	Estructura
33375	TD**L**ILK**K**L**K**KL**E**N**V**NKLIKY	ND	α-Hélice H3-K6;L8-E12;V14-I18
38150	- - - - - - **A** - **G** - - **Q** - **T** - -	1(320)	Hélice (DC)
38152	- - **H** - - - - - - - - **Q** - **T** - -	0	α-Hélice D2-K16

Ac: Anticuerpos**; ND**: No determinado

Por otro lado, se realizó una predicción de unión de estos péptidos a moléculas CMH II usando el servidor NetMHCIIpan 3.0 Server (117) y se encontró que el cHABP 33375 tiene preferencia por el alelo HLADRβ1*0804 y su mHABP inmunogénico (**38150**) tiene una alta afinidad por HLADRβ1*0102.

El cHABP 33375 aunque se une a HLADRβ1*0804 no tiene el motivo de unión (Tabla 10) correcto ya que para este alelo en el "pocket" 9 no se favorece la presencia de leucina (L) (118) que es el residuo presente en este péptido.

Mientras que su modificado el **38150** muestra el registro y el motivo de unión para el alelo HLADRβ1*0102, en el cual como se observa en la tabla 12 se encuentran dos de los reemplazos de aminoácidos realizados que corresponden a K7A y K9G, estos dos residuos en el péptido modificado A7 y G9 favorecen la unión a este alelo, entonces, **38150** muestra el motivo de unión adecuado para "pocket" 1, 4, 6 y 9 lo que conlleva a un mejor ajuste del péptido en el PBR del CMH II y por lo tanto una adecuada presentación al receptor de linfocitos T (RLT).

Tabla 12. Secuencias, registros y motivos de unión para el cHABP 33375 y su mHABP **38152**, obtenidos por NetMHCIIpan 3.0 Server

Péptido	Secuencia	HLA-DRβ*	Motivos de Unión
33375	TDLILKKLKKLENVNKLIKY	0804	P1P2P3P4P5P6P7P8P9 LILKKLKKL
38150	---A-G--Q-T--	0102	ILKALGKLQ

El cambio en el comportamiento estructural de los péptidos con respuesta inmune positiva (mHABPs) y los que no la tienen (cHABPs), ha sido evidenciado por varios trabajos realizados en la FIDIC, en los cuales se observa acortamientos o desplazamiento en las regiones helicales (13, 46) , formación de giros β (119) y presencia de hélice poliprolina tipo II ($PPII_L$) (120, 121) en los mHABPs respondedores.

Estos cambios estructurales permiten un mejor ajuste del péptido en las moléculas del CMH-II, una mejor presentación al RLT y por tanto una respuesta inmunitaria adecuada (120, 121). Lo cual está relacionado con lo sucedido en **38150** que al tener un contenido de α-hélice menor con regiones flexibles con respecto a **38152** y 33375, además de tener el registro y motivo de unión adecuado a HLADRβ1*0102 consiguió una apropiada formación del complejo trimolecular CMHII-péptido-RLT por consiguiente, se desencadena una respuesta inmunitaria.

Respecto a los péptidos modificados de SPECT-2 (Tabla 4), **38100** y **38130** derivados de 34935; **38972** y **38974** de 34936; **38092**, **38094** y **38120** modificados de 34941; **38114**, **38126**, **38958** y **38960** de 34949; **38116**, **38118** y **38124** derivados de 34951; no mostraron anticuerpos, lo que sugiere que las modificaciones de aminoácidos realizadas no fueron suficientes para cambiar el comportamiento estructural e inmunológico de estos péptidos, como sucedió con el cHABP 34941 y sus mHABPs **38092**, **38094**, **38120** (Tabla 13).

Tabla 13. Secuencias, anticuerpos obtenidos por IFI y estructura obtenida por ^{1}H-RMN y cálculo de estructura del cHABP 34941 y sus mHABPs **38092** y **38094**.

Péptido	Secuencia	Ac III_{20}	Estructura
34941	WDKTTAYK**NA**V**N**E**LP**AVFTG	0	α-Hélice A3-E13
38092	- - - - - - - - - - - - - - - **D** - - - - -	0	α-Hélice D2-T19
38094	- - - - - - - - - **S** - - - - **D** - - - - -	0	α-Hélice K7-D15
38120	- - - - - - - - **I** - - **D** - **HD** - - - - -	0	ND

Ac: Anticuerpos

Como se observa todos los péptidos tienen un comportamiento de α-hélice excepto el **38120** al cual no fue posible determinar su estructura por problemas de solubilidad en el solvente utilizado; la región α-helical en estos péptidos abarca aproximadamente el mismo número de aminoácidos en el 34941 y en **38094,** mientras que **38092** es más larga, lo que sugiere que son muy helicales para tener un adecuado ajuste en el PBR del CMH-II, debido probablemente a que la distancia entre el residuo que ajusta en el "pocket 1" y el "pocket 9" del PBR de su correspondiente molécula de HLA-DRβ1* (antígeno leucocitario humano; HLA, por sus siglas en ingles) es menor a la distancia que permite una apropiada formación del complejo CMH II-péptido (3), lo que conlleva a que no haya una adecuada presentación y por lo tanto no se origina una respuesta inmune.

Por el contrario, a los mHABPs **38890** derivado de 34938 y al **38128** de 34949 fue posible cambiar su comportamiento estructural causando una variación en su comportamiento inmunológico (Tabla 14). En el **38890** se observa una α-hélice por DC, mientras que su péptido nativo (34938) es "random", el cambio de S4A y S6A favoreció la formación de la hélice, que al parecer no debe ser una hélice muy larga, ya que los datos de deconvolución mostrados por SELCON3 (0,587) indica que aproximadamente el 58,7% de la secuencia está involucrada en la hélice y CDSSTR (0,347) sugiere un 35% de hélice, entonces, si esta región helical no es muy larga, lo más probable es que exista una buena acomodación del péptido sobre su correspondiente molécula de HLA-DRβ1* iniciando una adecuada respuesta inmunitaria. Por otro lado el **38128** el cual tiene una región con una hélice corta y otra $PPII_L$ la cual sería la estructura apropiada para formar el complejo CMHII-péptido, el cual se estabiliza por puentes de hidrogeno (116, 120, 121) para lograr una adecuada presentación al RLT y así mostrar una respuesta inmune convirtiendo a este mHABP en inmunogénico.

Con respecto al **38888** no se pudo obtener ninguna conclusión debido a que presento problemas de solubilidad, razón por la cual no se pudo determinar la estructura por ninguna de las técnicas utilizadas, en este estudio.

Tabla 14. Secuencias, títulos de anticuerpos obtenidos por IFI y estructura obtenida por DC o por ^{1}H-RMN de los cHABPs 34938 y 34949 y sus mHABPs.

Péptido	Secuencia	Ac III_{20}	Estructura
34938	YTK**S**L**SA**EA**K**V**SG**SYWGIAS	0	Random (^{1}H-RMN)
38890	SD - - - **A**-**A** - - - - - - - - - - - -	1(640)	Hélice (DC)
34949	KLTP**I**SDSFDSDD**LK**ESYDK	0	Hélice distorcionada S6-F9
38128	- - - - - - - - - - - - - - **T** - - - - - -	1(320)	$PPII_L/\alpha$–Hélice corta (DC)
38888	- - - - **N**- - - - - - - - **KK**- - - - -	1(320)	ND

Ac: Anticuerpos; **ND**: No determinada

En resumen el cambio en la estructura secundaria de los mHABPs con respecto a los cHABPs está relacionada con el acortamiento de regiones helicales o presencia de hélices cortas como lo observado en **38150** (33375, SPECT-1) y **38890** (34938, SPECT-2) o la presencia de estructuras $PPII_L$ acompañada de regiones helicales cortas como en **38128** (34949, SPECT-2), este tipo de estructuras tienen regiones más flexibles que le permiten a estos péptidos tener un adecuado ajuste en los bolsillos de unión del PBR del CMH-II, así como una apropiada distancia entre los “pockets” 1 y 9 del PBR, permitiendo la formación del complejo CMHII-péptido-RLT, consiguiendo un cambio en el comportamiento inmunológico de los péptidos, convirtiéndolos en inmunogénicos.

Entonces 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.

6.4. Conclusiones

Por medio del estudio de DC, ^{1}H-RMN y cálculo de estructura se determinó la estructura tridimensional de los péptidos nativos y modificados derivados de las proteínas SPECT-1 y SPECT-2.

Los cHABPs pertenecientes a SPECT-1 que se encuentran formando parte de la cavidad que une posiblemente colesterol, sugiere que ellos podrían estar involucrados en la unión de SPECT-1 a esta molécula, siendo parte significativa de la función que cumple la proteína en la unión o interacción inicial con la membrana de la célula hospedera.

La localización de los cHABPs derivados de SPECT-2 en el dominio MACPF de la proteína los hace blancos interesantes, debido a su participación en la formación de poros sobre la membrana de las células hospederas, lo cual está relacionado con la función principal de esta proteína en el paso del parásito a través de las células ("cell traversal") para finalizar en la invasión del hepatocito.

Mediante el estudio de la estructura de los péptidos conservados no inmunogénicos, se observó que ciertos cambios en aminoácidos específicos de la secuencia, inducen un cambio en la estructura 3D de los péptidos, permitiendo a los péptidos modificados convertirse en inmunogénicos inductores de anticuerpos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró una relación entre la estructura que adoptan los péptidos modificados con su actividad inmunológica.

Los resultados de este capítulo generaron tres publicaciones relacionadas en los anexos 1, 5 y 6:

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. 32:154-160

Alba MP, Suarez CF, Varela Y, Patarroyo MA, Bermudez A, Patarroyo ME. TCR-contacting residues orientation and HLA-DRβ* binding preference determine long-lasting protective immunity against malaria. BBRC. 2016. 477:654-670

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