

# Predicción de epítomos consenso de células B en el virus de la influenza H5N1

Raúl Isea<sup>1</sup>, Yudith Cardinale<sup>2</sup>, Andrés Ortega<sup>2</sup>

IDEA<sup>1</sup>, USB<sup>2</sup>

Hoyo de la Puerta, Baruta, Venezuela

risea@idea.gob.ve

Fecha de recepción: 12/12/2016

Fecha de aceptación: 27/03/2017

Pág: 106 – 110

## Resumen

Se determinarán los epítomos de células B presentes en el virus de la gripe A subtipo H5N1 con ayuda de los programas ElliPro, FCBPred, AAP y BepiPred. Posteriormente, se establecerá cuáles son los epítomos consenso de entre todos ellos para considerar aquellos que presenten menor movilidad según los resultados obtenidos por dinámica molecular mediante el programa NAMD. Gracias a esa metodología in silico será posible diseñar racional y automáticamente nuevas vacunas que contribuyan a combatir el virus de la gripe.

**Palabras clave:** epítomo, influenza, bioinformática, células B.

## Introducción

Hoy en día las vacunas contra la influenza son estacionales, es decir, se debe diseñar y administrar una nueva vacuna cada año. En la actualidad existen tres tipos de gripe designadas como A, B y C que se clasifican de acuerdo con la combinación de dos proteínas que componen la superficie del virus conocidas como hemaglutinina (H) y neuramidasa (N). Las del tipo A se caracterizan por ser las más patógenas: entre ellas, destaca la responsable de la gripe española de 1918 (H1N1), mientras que las del tipo B tienen incidencia casi exclusivamente en humanos, con una tasa de mutación menor que las del tipo A. Las del tipo C son las más frecuentes de las tres.

Recientemente se ha estudiado la posibilidad de emplear epítomos consenso de células B en el diseño racional de nuevas vacunas [1, 2, 3, 4]. Sin embargo, los predictores de epítomos B generan una amplia gama de epítomos que exige poder discriminarlos. A modo de ejemplo, citemos el reciente trabajo donde se predicen 636 epítomos de células B presentes en un solo serotipo de dengue en Venezuela [5], lo cual dificulta su validación experimental.

Por esa razón, se han propuesto algunas metodologías computacionales que permitan reducir el número de epítomos B basadas en la determinación de una función cuantitativa [1], así como

considerar aquellos que presenten menor movilidad según la hipótesis de que pueden ser más conservados (ver detalles en [6, 7]).

En vista de lo indicado anteriormente, el presente trabajo propone un procedimiento computacional que permitirá seleccionar aquellos epítomos de células B de una secuencia de influenza A, subtipo H5N1, aislada en 2010 en Egipto, que se ha abordado con detalle en la literatura científica [8].

## Metodología computacional

La metodología empleada en el trabajo se divide en dos partes. En primer lugar, se determinan los epítomos de células B empleando para ello cuatro programas de Bioinformática: ElliPro [9], FCBPred [10], AAP [11] y BepiPred [12], y después, gracias a los resultados obtenidos, se determinan aquellos epítomos consenso que presenten menor movilidad de los átomos, permitiendo así disminuir el número de epítomos que se pueden emplear en una potencial vacuna.

### Primera etapa: Predecir los epítomos de células B

A partir de la secuencia candidata para el diseño de una vacuna contra la influenza A, subtipo H5N1, aislada en 2010 [8], se determinan los distintos epítomos de células B con ayuda de cuatro programas computacionales: ElliPro [9], FCBPred [10], AAP [11] y BepiPred [12]. Una vez recopilados todos los resultados obtenidos, se determina el epítomo consenso de células B, es decir, se seleccionarán solo aquellos epítomos presentes en al menos tres de los predictores, cuya longitud sea igual o superior a cinco aminoácidos.

### Segunda etapa: Dinámica molecular

Se determina la movilidad de los distintos átomos presentes en los epítomos predichos utilizando el resultado obtenido por dinámica molecular. El procedimiento ya ha sido utilizado en la literatura científica [6, 7]. Es necesario conocer la estructura tridimensional de la proteína blanco indicada en la etapa anterior, cuyo identificador en la base de datos de proteínas PDB es 5E2Y. La dinámica se realizó con el programa NAMD, versión 2.5 [13], ejecutado en un clúster bajo el sistema operativo Linux, con un intervalo de tiempo de 1 fs. El tiempo total de las simulaciones de dinámica molecular fue de 2 ns. El campo de fuerza utilizado fue CHARMM, versión 27 [14], con una distancia de corte de 12Å. Este cálculo se efectuó en el vacío en vista del alto número de átomos presentes en la proteína. Los estados de protonación de los residuos ionizables fueron asignados y predichos con el algoritmo de Shakeh implementado en el software VMD para fijar la unión entre cada uno hidrógeno [15]. La velocidad y de posición se determinan de acuerdo a algoritmos Verlet al integrar las ecuaciones de movimiento [16]. El método de minimización de la energía es el algoritmo de descenso inclinado (precedido por una fase de posición con retención de átomos de la proteína) y un gradiente conjugado, cómputo que se detiene hasta que el gradiente de energía es menor a 1,0 kcal / mol / Å. Las simulaciones MD

se llevaron a cabo de acuerdo con los siguientes criterios: 50 ps con las posiciones de los átomos de la proteína restringida para permitir el equilibrado disolvente, 150 ps con las posiciones de los átomos de la proteína de la columna vertebral restringida, para permitir la liberación gradual del sistema, y luego una dinámica completa durante 2 ns sin restricción. Los B-factores derivados de la trayectoria se calculan como  $8/3 \pi^2 \langle |\Delta r|^2 \rangle$ , donde  $\langle |\Delta r|^2 \rangle$  es el cuadrado medio atómico, desplazamiento relativo a la posición media de todas las trayectorias de la dinámica molecular.

## Resultados

La secuencia patógena de influenza virus A fue analizada con cuatro programas de predicción de epítotos de células B. El programa BepiPred generó 15 epítotos con una longitud igual o superior a cuatro aminoácidos. Con el programa ElliPro se predijeron ocho epítotos, con AAP solo seis, y con FBCPred, 13 epítotos.

El paso siguiente fue obtener los epítotos consenso a partir del consenso de tres o cuatro predictores. El consenso fue de solo seis epítotos: GYHANNSTEQVDTIMEK (comprendido en el intervalo de la posición 10 hasta la 26), ITPKNSWSDHEASG (120-133), YNNTNQEDLLV (167-177), TEQTRLYQNPTTYI (188-201), EYGDCNT (273-279) y LRNSP (320-324). En la figura 1, se muestran los cuatro resultados obtenidos de cada uno de los predictores indicados anteriormente, donde se distinguen los epítotos consenso con color marrón.

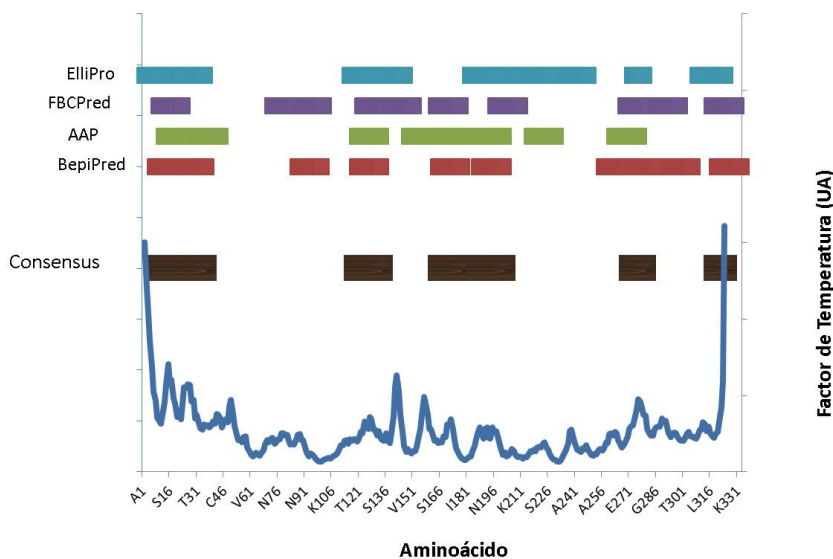


Figura 1: La predicción de los epítotos B de acuerdo a ElliPro (barra azul claro), FBCPred (morada), AAP (verde) y BepiPred (ladrillo); en marrón se indican los epítotos consenso de células B. Con línea continua se muestra la movilidad de los átomos obtenida tras un análisis de resultados por dinámica molecular.

El último paso fue determinar la movilidad de la proteína de la influenza A: se calculó la desviación cuadrática media de la posición de todos los átomos a partir de las coordenadas derivadas de la resolución de la estructura de rayos X hasta 2 ns, como se observa en la figura 1 (línea continua en color azul). Los epítomos comprendidos entre los aminoácidos 10 y 26, así como el localizado entre 320 y 324, se deben descartar por presentar mayor movilidad. De hecho, es de esperar dicho comportamiento al no considerar átomos de agua para la solvatación del sistema, pero esta no fue posible por la alta demanda computacional que requeriría.

## Conclusiones

Se determinaron cuatro epítomos consenso de células B de una cepa altamente patógena aislada en Egipto en 2010. A partir de esa cepa, se identifican *in silico* cuatro posibles epítomos que pueden ser candidatos a desarrollar una vacuna siguiendo la metodología descrita en el trabajo. Los epítomos son ITPKNSWSDHEASG, YNNTNQEDLLV, TEQTRLYQNPTTYI y EYGDCNT.

La metodología es netamente computacional y requiere validaciones *in vivo* para corroborarla, pero es interesante destacar que es posible desarrollar un procedimiento automático que permitirá generar vacunas *in silico* empleando únicamente los datos de la secuencia de aminoácidos de la proteína problema así como sus datos de la estructura cristalina.

## Bibliografía

- [1] Isea, R. (2015). Predicción computacional cuantitativa de epítomos de células B. *VacciMonitor*, 24:93–97.
- [2] Isea, R. (2013). Predicción de epítomos consenso de células B lineales en *Plasmodium falciparum* 3D7. *VacciMonitor*, 22:43–46.
- [3] Isea, R., Hoebeke, J. y Mayo-García, R. (2013). Designing a peptide-dendrimer for use as a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* 3D7. *American Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 1:1–8.
- [4] Isea, R. (2010). Identificación de once candidatos vacunales potenciales contra la malaria por medio de la Bioinformática. *VacciMonitor*, 19:15–19.
- [5] Isea, R. (2016). Quantitative prediction of linear B-cell epitopes. Aceptado para su publicación.
- [6] Isea, R., Ramírez, JL. y Hoebeke, J. (2010). Assessing protein stability of the dimeric DNA-binding domain of E2 human papilloma virus 18 with molecular dynamics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105:123.

- [7] Isea, R., Hoebeke, J. y Mayo-García, R. (2013) In silico characterization of major capsid protein L1 of human papilloma virus type 16 by molecular dynamics and determination of linear B-cell consensus epitopes. En Harris B. Smith Editors, *Handbook on Human Papilloma Virus: Prevalence, Detection and Management* (pp. 433–444). Nueva York: Nova Publishers.
- [8] Zhu, X., Viswanathan, K., Raman, R., Yu, W., Sasisekharan, R. y Wilson, IA. (2015) Structural Basis for a Switch in Receptor Binding Specificity of Two H5N1 Hemagglutinin Mutants. *Cell*, 13:1683–1691.
- [9] Ponomarenko, J., Bui, H., Li, W., Fusseder, N., Bourne, PE., Sette, A. y Peters, B. (2008). ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*, 9:514.
- [10] El-Manzalawy, Y., Dobbs, D. y Honavar, V. (2008). Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *Journal of Molecular Recognition*, 21:243–255.
- [11] Chen, J., Liu, H., Yang, J. y Chou, K. (2007). Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*, 33:423–428.
- [12] Larsen, JE., Lund, O. y Nielsen, M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*, 24:2.
- [13] Kale, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Krawetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., Varadarajan, K. y Schulten, K. (1999). NAMD2: greater stability for parallel molecular dynamics. *J Comput Phys*, 151:283–312.
- [14] MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera, J., Yin, D. y Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *Phys Chem B*, 102:3586–3616.
- [15] Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K. (1996). VMD - Visual molecular dynamics. *J Mol Graphic Model*, 14:33–38.
- [16] Ryckaert, JP., Icrotti, G. y Berendsen, JJC. (1997). Numerical integration of the cartesian equation of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys*, 23:327–341.