

Hallazgo de patrones para péptidos-vacuna con capacidad de acople universal en moléculas de HLA-II

 25 min.



En el siguiente trabajo el Instituto de Investigación en Vacunas Sintéticas, Antisuero y Nuevos Medicamentos en colaboración con el laboratorio de Investigación en Química de Productos Naturales de la Universidad de Cauca, Colombia, nos describen la metodología utilizada que les permitió obtener un patrón de acople universal para péptidos presentados por las moléculas de histocompatibilidad. Este hallazgo permitirá el diseño de péptidos-vacuna o vacunas proteicas con alta capacidad de binding.



Adrián Cortés (1a),
Jonathan Coral (1b),
Ricardo Benítez Benítez (2b)

1. Químico.

2. Magíster en Ciencias Químicas. Ph. D. Profesor Titular.

a. Instituto de Investigación en Vacunas Sintéticas, Antisuero y Nuevos Medicamentos IVSI; CP 190002, 3006234641; Popayán - Cauca, Colombia.
b. Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad del Cauca. CP 190002, 8209800 Ext. 2334; Popayán - Cauca, Colombia.

Acta Bioquím Clín Latinoam 2013; 47 (3): 541-9



Correspondencia

Ricardo Benítez Benítez
Departamento de Química, Universidad del Cauca. Cauca, Colombia
E-mail: rbenitez@unicauca.edu.co



Resumen

Partiendo del alineamiento múltiple de secuencias proteicas humanas obtenidas de las bases de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) y su posterior análisis espacial tridimensional, se estableció la existencia de un patrón de acople universal para péptidos presentados por las moléculas de histocompatibilidad HLA-II (DR, DP y DQ), siendo una base para el diseño de vacunas proteicas. Estos patrones espaciales fueron claramente exhibidos por los residuos altamente conservados de los tres tipos de moléculas de HLA-II. La aplicación de este nuevo hallazgo permitió diseñar péptidos con mejores valores de acople péptido-HLA-II, que los generados por el péptido de acople universal conocido como CLIP (class II-associated invariant chain peptide).

Palabras clave: alineamiento múltiple * Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II * péptido asociado a la cadena invariante del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II * antígenos leucocitarios humanos tipo II * diseño de vacunas

Introducción

Los tres tipos de moléculas de histocompatibilidad del HLA-II DR, DP y DQ actúan como presentadoras de antígeno a las moléculas TCR presentes en las células T-helper. Estos tres tipos de moléculas de HLA-II son altamente polimórficas pero presen-

tan estructuras tridimensionales comunes, como la hendidura conformada por las dos cadenas proteicas A y B, entre las cuales se acoplan los péptidos de origen extracelular que serán presentados.(1)

El alto polimorfismo de los tres isotipos de HLA-II humano (DR, DP y DQ) es lo que dificulta la predicción y diseño de péptidos-vacuna con un acople efectivo a estas moléculas.(2-4) En el mecanismo de presentación de antígenos se han identificado tres problemas que restringen la presentación de los péptidos vacuna:

1. Garantizar la entrada del péptido-vacuna a la hendidura de la molécula de HLA-II. Este aspecto es limitado por factores de impedimento estérico, ocasionado por las cadenas laterales de los aminoácidos del antígeno presentado, además, es necesario evitar los mecanismos de repulsión electrostática generados por residuos con cargas eléctricas iguales entre el péptido presentado y las moléculas de HLA-II, lo cual inhibe el acople(5).
2. Obtener suficiente estabilidad de acople en el complejo formado entre el HLA-II y el péptido, para garantizar prolongados tiempos de presentación del antígeno-vacuna y consecuentemente una efectiva activación de memoria inmunogénica(6)(7).
3. El complejo HLA-II/péptido debe presentar un registro de enlace único, de otro modo habrá poca o ninguna activación de los receptores TCR de las células T-helper(8).

Con los hallazgos obtenidos en la presente investigación, se postula la exis-

tencia de patrones moleculares universales en las moléculas de HLA-II (DR, DP y DQ) lo cual abre la posibilidad de realizar un diseño lógico, rápido y efectivo de péptidos candidatos para vacuna contra cualquier patógeno existente.

Materiales y Métodos

Para la realización de esta investigación se analizaron 299 secuencias proteicas de HLA-II, presentes en la NCBI, base de datos del NIH (National Institutes of Health) de libre acceso.

La búsqueda de homología para las moléculas de HLA-II (DP, DQ, DR) se ejecutó mediante comparación de alineamientos realizados con algoritmos bioinformáticos para residuos de aminoácidos altamente conservados, además de ubicarlos en las estructuras 3D de los dominios de la proteína, usando sistemas de HLA-II con péptido acoplado, mediante los

programas Cn3D (visualizador de estructuras macromoleculares, versión 4.3, 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) y Jmol (Visor Java de código abierto para estructuras químicas en tres dimensiones, versión 12.0, 2011; <http://www.jmol.org/>).

Se utilizó la herramienta de investigación de alineamiento local conocida como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)(9) a fin de reconocer los dominios conservados con estructura 3D de las proteínas de histocompatibilidad clase II. El hallazgo de secuencias proteicas y estructuras tridimensionales se realizó en las bases de datos del NCBI y PDB (Protein Data Bank) utilizando dominios de proteínas cristalografiadas, encontrando los alotipos DP (MMDB: 81423 / PDB: 3LQZ), DQ (MMDB: 51735 / PDB: 1UVQ) y DR (MMDB: 764 / PDB: 1DLH), los cuales fueron elegidos por presentar complejos HLA-II/péptido, y los complejos proteicos HLA-II-DR/Pép-

tido/TCR (MMDB:88951 / PDB: 3O6F). Se depuraron estos bancos eligiendo únicamente secuencias humanas. Con la información ya seleccionada, se realizó la búsqueda de los residuos altamente conservados en esta base de datos mediante alineamiento múltiple con herramientas como t-coffe y Clustal-W. Los parámetros para escoger los residuos de aminoácidos fueron principalmente la conservación en diferentes secuencias que están en el banco de datos depurado, tomado del NCBI (12 secuencias mínimo y 17 secuencias máximo). Posteriormente, los residuos fueron localizados en las estructuras virtuales reportadas, mediante el uso de las herramientas Cn3D y Jmol.

La cuantificación de los valores de binding de los péptidos inferidos por la metodología usada a las moléculas de HLA-II se realizó con el algoritmo MultiRTA(10)(11), cuyos resultados fueron tabulados y graficados.



Mucho más que resultados.



www.iaca.com.ar

IACA
LABORATORIOS

Genética Molecular
Filiación
Estudios Forenses
Citometría de Flujo
Enf. Metabólicas
Screening Neonatal
Toxicología Laboral
Enf. Infecciosas
Histocompatibilidad



Sede Central Bahía Blanca: San Martín 68 | (B8000BIF) | Tel: +54 0291 459-9999 | laboratorios@iaca.com.ar
Sede Buenos Aires C.A.B.A: Tel: +54 011 43710046 | Móvil: 011 15 513 22214 | buenosaires@iaca.com.ar
Sede Mar del Plata: Móvil: 0223 15 424 9300 | mardelplata@iaca.com.ar



STAMBOULIAN
LABORATORIO



PORQUE UN DIAGNÓSTICO PRECISO NECESITA RESULTADOS CONFIABLES.

Nuestro laboratorio integral está al servicio del profesional, brindando resultados confiables y asesoramiento en su interpretación, facilitando información precisa para colaborar en el diagnóstico, seguimiento y prevención de las enfermedades.

Nuestro compromiso: brindar un servicio personalizado a través de un equipo de especialistas, cumplir con los más exigentes estándares de calidad, y garantizar confiabilidad y exactitud en los resultados.

/ Biología Molecular
/ Citometría de Flujo
/ Hematología y Hemostasia
/ Inmunoserología

/ Microbiología
/ Química Clínica
/ Endocrinología
/ Virología

PLANTA DE LABORATORIO
Av. Scalabrini Ortiz 676

DPTO. COMERCIAL LABORATORIO
4858-7061 al 63

laboratorio@stamboulian.com.ar

Centro de Atención Telefónica
5411 4515-3000

www.stamboulian.com.ar

STAMBOULIAN
PRIMERO, LA SALUD



Tabla II. Residuos de las secuencias de HLA-II altamente conservados en los bancos de datos del NCBI. A y B es la notación de las cadenas α y β de las moléculas de HLA-II

Residuos de aminoácido	Número del residuo en la secuencia del HLA-II, en las cadenas A y B.					
	DP		DQ		DR	
	A*	B*	A*	B*	A*	B*
A	--	--	--	--	--	--
C	107	15, 115, 171	110	15, 117, 173	107	117, 173
D	27	150	30	152	--	--
E	130	--	133	--	--	--
F	32, 113, 145	120	35, 116, 148	122	145	122
G	100, 131	149, 166	103, 134	151, 168	131	151, 168
H	5, 167	175	7, 170	177	167	177
I	--	--	--	--	--	--
K	--	--	--	--	--	--
L	105, 151	113, 159	108, 154	115, 161	105, 151	115, 161
M	--	--	--	--	--	--
N	103	31, 60, 132, 148	106	33, 62, 134, 150	103	134, 150
P	102, 114, 115, 155	95, 122, 163	105, 117, 118, 158	97, 124, 160	102, 114, 115, 155	97, 124, 165
Q	14, 57	154	17, 60	156	57	156
R	--	70, 91	--	72, 93	--	72, 93
S	--	--	--	--	--	--
T	--	152, 170	--	154, 172	--	154, 172
V	91	97, 117, 173	94	99, 119, 175	91 (128)	99, 119, 175
W	121	129, 151, 186	124	131, 153, 188	121	131, 153, 188
Y	150	121, 169	153	123, 171	150	123, 171

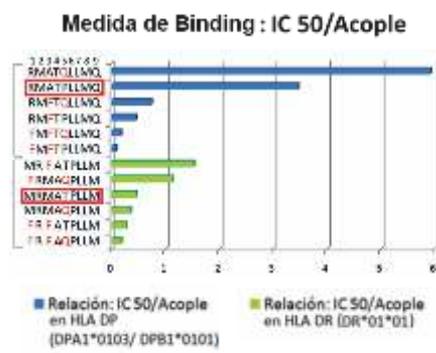


Tabla V. Residuos altamente conservados en HLA-II (DP, DQ y DR) que cumplen el criterio de interacción por iguales.

Tipo de cadenas	Residuos de HLA-II altamente conservados y en contacto físico con el péptido presentado			
	DQ	DP	DR	Posición
Cadena A de HLA-II	F35	F32	F32	3
	Q60	Q57	Q57	5



Figura 4. Medida de binding; relación IC50/Acople de los CLIP sustituidos en posiciones 1, 3 y 5 calculados con el software MultiRTA(10)(11).



En la Tabla VI (a y b) se exponen los resultados de cuantificación del binding de los péptidos CLIP sustituidos por los residuos sugeridos en las Tablas III y IV.

La Figura 4 representa la cuantificación del binding de los péptidos CLIP sustituidos por los residuos sugeridos en las Tablas III y IV.

La Tabla VII muestra seis péptidos diseñados fusionando los dos criterios de campos planares e interacción por iguales en un solo péptido, reuniendo los modelos de las Tablas III y IV.

Discusión

La búsqueda en dominios conservados de las secuencias de proteínas del HLA-II encontradas en el banco de datos del NCBI, condujeron a la identificación de residuos puntuales de alta conservación en los tres tipos de moléculas HLA-II de secuencias humanas. En la Figura 1 se observa un ejemplo de alineamiento múltiple del dominio MHC-II α de la proteína HLA-DR1 (MMDB: 764/PDB: 1DHL), el cual muestra el análisis de un segmento de 50

residuos de las secuencias humanas escogidas, indicando su alta conservación al pie con un asterisco (*).

Bajo este criterio de alta conservación (columnas de letras con asterisco, como en este caso 14/14), se localizaron las posiciones de los residuos encontrados en las secuencia de las proteínas de HLA-II, arrojando los resultados de las Tablas I y II. En la Tabla I se observan los residuos altamente conservados encontrados en moléculas de TCR's; en la Tabla II se expone el número correspondiente a los residuos altamente conservados en las secuencias de los tres tipos de moléculas de HLA-II (DP, DQ y DR), tanto en sus cadenas A como B. En estos resultados se observa que las cadenas del tipo HLAII/DR se relacionan con las otras dos moléculas DP y DQ por similitud de conservación de residuos. Esto es claro si se observa la cadena A del tipo DP (DP-A), y la cadena B del tipo DQ (DQ-B), las cuales presentan relación con las cadenas A y B del tipo DR, respectivamente. Otro aspecto que subyace en estos datos es que existen pequeñas diferencias en la posición secuencial de residuos entre las cadenas A del tipo DQ (DQ-A) y B del tipo DP (DP-B), las cuales presentan tres residuos menos en DQ-A y dos residuos menos en DP-B, con respecto a las cadenas A y B del tipo de HLA-II/DR. Al localizar espacialmente estos residuos en las estructuras 3D de cada molécula de HLA-II (DP, DR y DQ) fue posible establecer la relación en la conformación espacial de estas tres proteínas, de manera similar a lo reportado por otros estudios (12). Este patrón se aprecia en la Figuras 2 y 3.

La localización espacial de los residuos altamente conservados en cada una de las estructuras tridimensionales de las proteínas de histocompatibilidad humana clase II y TCR's, exhibieron patrones bien definidos de alineamiento en el espacio, formando un sistema de planos tal como se expone en las Figuras 2 y 3, donde se observan alineamientos planares de los residuos de asparaginas (Figura 2) y de triptófanos (Figura 3) altamente conservados en las proteínas HLA-II/DP (PDB:3LQZ) y el complejo HLA-II-DR/Péptido/TCR (PDB:3O6F),



Tabla VI. Predicciones de acople a moléculas de HLA-II de las secuencias CLIP sustituidas en posiciones 1, 3 y 5 por residuos F, F y Q, respectivamente; para a) tipo DR y b) tipo DP.

Secuencia	Sustituciones por	Acople (Kcal/mol)	IC 50 (nM)	Relación (IC50/Acople)
FRFAGPLL	F1, F3 y Q5	11,6	2	0,17
FRFATPLL	F1 y F3	11,5	3	0,26
MRMAGPLL	Q5	11,4	4	0,35
MRMATPLL	--	11,2	5	0,45
FRMAGPLL	F1 y Q5	10,7	12	1,12
MRFATPLL	F3	10,5	16	1,52

b) Cálculos de acople en HLA-DRB1*0101 para péptidos CLIP con sustituciones de los aminoácidos sugeridos en la Tabla IV:

Secuencia	Sustituciones por	Acople (Kcal/mol)	IC 50 (nM)	Relación (IC50/Acople)
FMFTPLL	F1 y F3	12,0	1	0,08
FMFTQLL	F1, F3 y Q5	11,7	2	0,17
RMFTPLL	F3	11,2	5	0,45
RMFTQLL	F3 y Q5	10,9	8	0,73
RMATPLL	--	10,1	35	3,46
RMATQLL	Q5	9,8	58	5,92

a) Cálculos de acople en HLA-DRB1*0101 para péptidos CLIP con sustituciones de los aminoácidos sugeridos en la Tabla IV. Los residuos aparecidos en rojo son las sustituciones propuestas por el criterio de interacción por iguales. Las dos secuencias azules representan los dos registros de enlace del péptido CLIP en cada HLA-II estudiado (DR y DP). En cuanto más pequeña sea la relación (IC50/Acople) el acople del péptido será mejor. Se toma como referencia de acople al péptido CLIP (resaltado en color azul), el cual tiene una relación (IC50/Acople) de 0,45 y 3,46 en los tipos DR y DP, respectivamente.



Tabla VII. Medidas de binding en secuencias de CLIP sustituidos de acuerdo a los criterios de campos planares y apareamiento de iguales aplicados simultáneamente, calculados con el software MultiRTA(10)(11).

Tipo de HLA-II	Secuencia	Sustituciones por	Acople (Kcal/mol)	IC ₅₀ (nM)	Relación (IC50/Acople)
DR	WRMATPLL	W1	11,73	2	0,170
	MYMATPLL	Y2	11,16	5	0,448
	WYWATPLL	W1, Y2, W3	11,19	5	0,447
	MRMATPLL	--	11,20	5	0,446
DP	LYWTPLL	L1, Y2 y W3	11,41	4,00	0,351
	WYWTPLL	W1, Y2 y W3	10,25	25,00	2,439
	RYATPLL	Y2	10,19	28,00	2,748
	RMATPLL	--	10,10	35,00	3,465

Las secuencias en azul corresponden a las secuencias de CLIP nativas acoplantes a DR y DP, respectivamente. Los residuos en color rojo son las sustituciones aplicadas simultáneamente por los criterios de apareamiento de iguales y campos planares.

**Antes de solicitar un
análisis clínico,
lo primero que hay que
es el**

**analizar
laboratorio.**

Más de 30 años de trayectoria dedicados al cuidado de los pacientes.

OAA ✓

Organismo
Argentina de
Acreditación

Laboratorio Clínico

LM 013
Consulte siempre acreditación
en: www.oaa.org.ar

La excelencia se construye desde
la calidad, la tecnología y el profesionalismo.
Resultados confiables para efectuar
diagnósticos ciertos.



LABORATORIO DE MEDICINA
ANÁLISIS CLÍNICOS | Dr. Raul Gutman

www.labmedicina.com - Tel: 011 4514 9370 - Acreditado Norma ISO 15189

respectivamente. Este alineamiento planar se aprecia desde otra perspectiva en las Figuras 2b y 3b, donde una vista lateral a los planos muestra el alineamiento de las cuatro asparaginas y los seis triptofanos, respectivamente. Este fenómeno de configuración planar se presentó por igual en todos los residuos altamente conservados de las tres proteínas de HLA-II estudiadas (DR, DP y DQ). En conformidad a lo anterior, los autores de esta investigación plantean como hipótesis que el fenómeno de configuración planar entre los aminoácidos altamente conservados, se debe a la existencia de campos electromagnéticos planares que intercomunican a los residuos iguales. Tales planos se hallaron de forma recurrente en la conformación espacial de las tres clases y subclases de las moléculas de histocompatibilidad clase II, aún a pesar del alto polimorfismo exhibido por todas estas moléculas, lo cual constituye a los planos en un patrón espacial invariable y común a todas ellas.

Este fenómeno de arreglos planares entre los aminoácidos altamente conservados hallados en esta investigación puede compararse análogamente con los planos macroscópicos exhibidos por las galaxias (20), donde este tipo de arreglos se deben a los efectos de largo alcance ocasionado por las fuerzas gravitacionales, mientras que en las proteínas estos arreglos podrían atribuirse a los efectos de fuerzas electromagnéticas que comunican y estabilizan residuos iguales altamente conservados. Este fenómeno de planos también quedó evidenciado al estudiar complejos proteicos completos de HLA-Péptido-TCR (PDB: 3O6F) presentados en la Figura 3, donde se observa que los campos planar es trascienden a todo el complejo, mediante una alineación planar de residuos iguales (en este caso W). Este fenómeno se repite con otros aminoácidos como C y Y (resultados no mostrados), cuyo denominador común es su alta conservación en las proteínas HLA-DR y TCR respectivamente, según los bancos de datos del NCBI.

A partir de los patrones planares que se proyectan desde las moléculas de

HLA-II hacia el péptido presentado, se infirió una secuencia teórica de péptido con capacidad de acople universal a los tres tipos de HLA-II (DR, DP y DQ). El péptido teórico resultante es presentado en la Tabla III, la cual muestra las posiciones y residuos que favorecen el acople en cada posición.

En la Tabla III, se observan las posiciones en los "bolsillos" (pockets) de las moléculas de histocompatibilidad humanas que favorecen el anclaje de diferentes residuos de aminoácidos en un péptido presentado según nuestro modelo de campos planares. En las posiciones 1 y 2 se aceptan residuos aromáticos como triptófano (W) y tirosina (Y), además de sustituciones por prolina (P) y leucinas (L). Esta promiscuidad de acople de residuos en estas dos primeras posiciones es debida a la convergencia de campos planares sobre un mismo punto. Así, sobre la posición 1 convergieron campos planares de W, P, L, y sobre la posición 2 convergieron campos planares de Y, P, L. Una corroboración de estos resultados se halla en estudios experimentales realizados por otros investigadores, que muestran una alta prevalencia de los residuos W, Y, L, en estas posiciones en los tres tipos de HLA-II: DR, DP y DQ como lo exponen Castelli et al. (13), Wiesner et al. (14) y Wahlström et al. (15), respectivamente. Igualmente, los residuos de las posiciones 6, 8, 10, 11, 12 y 13 fueron predichos también por los patrones de planaridad del modelo desarrollado.

El patrón de residuos aminoácidos de la Tabla III, inferido por los autores de esta investigación fue comparado con la secuencia de acople universal conocida como CLIP (Secuencia de residuos del CLIP (81-109): LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPMGALPQ (10)(11)(14)(16), la cual presentó coincidencias en el segmento (96-108) PLLMQALPMGALP en las posiciones 1, 2, 12 y 13 con los residuos prolina (P) y leucina (L) del modelo teórico encontrado. Este segmento del péptido CLIP es una secuencia alternativa de alto acople frente a moléculas del tipo DQ según Wiesner et al. (13), además de que las posiciones 1, 2, 12 y 13 con sustituciones por prolina (P) y leucina (L) son aceptadas en los tipos DP y

DR según los siguientes autores: Doytchinova et al. (17), Cohen et al. (18); Dai et al. (19).

Lo anterior, respalda el patrón de residuos inferido a partir del sistema de campos planares de los residuos altamente conservados en los tres tipos de moléculas de HLA-II, permitiendo la elucidación de secuencias peptídicas de posible acople universal, lo cual será expuesto más adelante.

Según un principio de la teoría electromagnética (21)(22) el campo generado por una partícula crea un sistema de interacción a distancia inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre las partículas implicadas, lo cual, en este modelo de campos planares indica que la interacción por contacto físico entre residuos iguales debe generar un máximo de fuerza de interacción. A partir de esto se infiere que el contacto físico entre aminoácidos iguales es altamente favorable en términos de fuerza de acople; esto se ha denominado interacción por iguales. Los residuos altamente conservados del HLA-II con capacidad para hacer contacto físico directo con los péptidos presentados (residuos F1, F3 y Q5) son mostrados en la Tabla IV.

Los residuos de interacción por contacto directo de la Tabla IV, además de conservar su posición espacial en las moléculas de HLA-II, interactúan con los residuos 3 y 5 de los péptidos presentados, respectivamente (Tabla V).

En la Tabla V se observan los residuos de alta conservación y contacto físico directo con el péptido presentado, los cuales incrementan el binding en el complejo HLA-II/péptido, según el principio de interacción por iguales. Para verificar lo dicho, se analizó el acople de la secuencia universal CLIP con sustituciones en las posiciones sugeridas por la Tabla IV, mediante el algoritmo MultiRTA programado para cuantificar el grado de binding y su correspondiente registro de enlace en los tipos moleculares DR y DP (9)(10). Los resultados de las sustituciones realizadas

**Los bioquímicos de todo el país
cuentan con nosotros**

Somos Socios Complementarios

Informes: (5411) 4508 2091 - www.manlab.com.ar

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

sobre el péptido CLIP se presentan en la Tabla VI.

En la Tabla VI (a y b) las secuencias sustituidas se encuentran organizadas de mayor a menor binding de arriba hacia abajo. Se tomó como medida del binding la relación IC50/acople, la cual indica que a menor valor numérico mejora el acople del péptido con la molécula de HLA-II. Para un mejor análisis, los resultados de la Tabla VI se graficaron en la Figura 4.

La Figura 4 expone cómo se ven afectados los binding de los CLIP sustituidos. Las barras azules indican los resultados de acople obtenidos en el HLA-DP y las barras verdes en el tipo HLA-DR. Los resultados de medida del binding de los CLIP sustituidos se compararon con respecto al binding de las secuencias CLIP nativas (secuencias con recuadro rojo) para cada HLA-II analizado. Como se observa, la secuencia del CLIP con las sustituciones mostradas por debajo de las dos secuencias en recuadro rojo tienen mejor acople que el segmento nativo de CLIP, lo cual muestra que estos residuos de contacto físico directo estabilizan altamente la unión del péptido. Este fenómeno se puede homologar al de la formación de estructuras altamente estables como las micelas o las membranas celulares de bicapa lipídica(23).

Finalmente, seis péptidos teóricos fueron diseñados combinando los dos criterios simultáneamente, el de campos planares y el de interacción por iguales, fusionando los modelos de las Tablas III y IV, cuyos resultados de binding se exponen en la Tabla VII. Se observa que las relaciones de IC50/acople de los péptidos diseñados para HLA-II/DR, tuvieron valores similares o mejores que CLIP. Para los péptidos diseñados para HLAII/DP se obtuvieron en todos los casos mejores valores de binding que para CLIP. Estos resultados confirman incrementos del acople péptido/HLA-II mediante la aplicación simultánea de los dos criterios mencionados en este estudio.

Conclusiones

Mediante la metodología

planteada en este trabajo, se logró inferir un patrón peptídico con capacidad de acople universal a todas las moléculas de HLA-II (DR, DP, DQ), lo cual es de gran utilidad para el diseño de péptidos-vacuna o vacunas proteicas, con alta capacidad de binding. Igualmente, con estos hallazgos se diseñaron varios péptidos con mejor capacidad de acople a moléculas HLA-II que el péptido de acople universal conocido como CLIP, lo cual confirma la validez de las dos hipótesis planteadas por los autores. Finalmente, se descubrieron dos fenómenos nunca antes descritos por la ciencia de la proteómica, consistentes en la existencia de campos electromagnéticos planares en las proteínas y el apareamiento de residuos aminoácídicos iguales en las mismas macromoléculas, al cual se denomina interacción por iguales.

Se descubrieron patrones espaciales de tipo planar en los residuos altamente conservados de las moléculas de HLA-II, que determinan la capacidad de enlace de cada uno de los aminoácidos del péptido-vacuna con esta molécula, independientemente de su polimorfismo, lo cual puede ser de gran utilidad para el diseño de péptidos con fuerte acople y amplia promiscuidad de enlace en las diferentes moléculas de HLA-II.

Los campos planares mencionados trascienden a todo el complejo HLA-Péptido-TCR, indicando que estos planos cumplen con la funcionalidad adicional de provocar los acoples intermoleculares entre estas tres moléculas.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto de Investigación en Vacunas Sintéticas, antisuero y Nuevos medicamentos "IVSI" y a la Universidad del Cauca por la infraestructura para el desarrollo del modelo.

Referencias bibliográficas

1. Reinherz EL, Tan K, Tang L, Kern P, Liu J, Xiong Y, et al. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC Class II. *Science* 1999; 286: 1913-21.
2. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JI, et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-9.
3. Jones EY, Lars F, Strominger JL, Siebold C. MCH class II proteins disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 271-82.
4. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, Strominger JL. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 1993; 178: 27-47.
5. Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, et al. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol* 1998; 160: 3363-73.
6. Sato AK, Zarutskie JA, Rushe MM, Lomakin A, Natarajan SK, Sadegh-Nasseri S, et al. Determinants of the peptide-induced conformational change in the Human Class II Major Histocompatibility Complex Protein HLA-DR1. *J Biol Chem* 2000; 275: 2165-73.
7. Hammer J, Belunis C, Bolin D, Papadopoulos J, Walsky R, Higelin J, et al. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4456-60.
8. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to CMH class II molecules. *Nature* 1991; 353: 622-7.
9. Altschul FS, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.
10. Bordner AJ, Mittelman HD. Prediction of the binding affinities of peptides to class II MHC using regularized thermodynamic model. *BMC Bioinformatics* 2010; 11: 41-52.
11. Bordner AJ, Mittelman HD. MultiRTA: A simple yet reliable method for predicting peptide binding affinities for multiple class II MHC allotypes. *BMC Bioinformatics* 2010; 11: 482-93.
12. Greenbaum J, Sidney J, Chung J, Brander

C, Peters B, Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics* 2011; 63: 325-35.

13. Castelli FA, Buhot C, Sanson A, Zarour H, Pouvelle- Moratille S, Nonn C, et al. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptidebinding specificity. *Immunol* 2002; 169: 6928-34.

14. Wiesner M, Stepniak D, de Ru AH, Moustakis AK, Drijfhout JW, Papadopoulos GK, et al. Dominance of an alternative CLIP sequence in the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. *Immunogenetics* 2008; 60: 551-5.

15. Wahlström J, Dengjel J, Persson B, Duyar H, Rammensee HG, Stevanovič S, et al. Identification of HLADR-bound peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis. *J Clin Invest* 2007; 117 (11): 3576-82.

16. Lee C, McConnell HM. A general model of invariant chain association with class II major histocompatibility complex proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8269-73.

17. Doytchinova IA, Flower DR. In silico identification of supertypes for class II MHCs. *J Immunol* 2005; 174: 7085-95.

18. Cohen WM, Pouvelle-Moratille S, Wang XF, Farci S, Munier G, Charron D, et al. Scanning the HIV genome for CD4+ T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent HLA class II molecule. *J Immunol* 2006; 176: 5401-8.

19. Dai S, Crawford F, Marrack P, Kappler JW. The structure of HLA-DR52c: Comparison to other HLA-DRB3 alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 11893-7.

20. Kautsch SF. The nature of flat galaxies.

PhD Thesis, University of Basel, Faculty of Science, 2006.

21. Cheng M, Gao H, Zhang Y, Tremel W, Chen JF, Shi F, et al. Combining magnetic field induced locomotion and supramolecular interaction to micromanipulate glass fibers: toward assembly of complex structures at mesoscale. *Langmuir* 2011; 27: 6559-64.

22. Ford GW, Weber WH. Electromagnetic interactions of molecules with metal surfaces. *Physics Reports* 1984; 113: 195-287.

23. Zhu Q, Vera C, Asaro RJ, Sche P, Sung LA. A Hybrid Model for erythrocyte membrane: a single unit of protein network coupled with lipid bilayer. *Biophys J* 2007; 93: 386-400.



DIAGNOS MED S.R.L.



Conesa 859 (C1426AQR) CABA
Tel. 011 4552-2929 (Rot.) - Fax 011 4551-5296
info@diagnosmed.com - www.diagnosmed.com

EUROIMMUN



www.euroimmun.com

- Neurologia
- Endocrinologia
- Gastroenterologia
- Reumatologia

RSR

Diagnostics for Autoimmunity
www.rsrttd.com

- Acetylcholine Receptor Ab
- Steroid 21-Hydroxylase Ab
- Zinc Transporter 8 Ab
- Glutamic Acid Decarboxylase
- IA-2 Ab
- Aquaporin 4 Ab
- TSH Receptor Ab



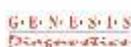
www.zentech.com

- Kits Screening Neonatal
- MSUD, Biotinidasa, G-6-PD, Fibrosis Quistica

AnshLabs.

www.anshlabs.com

- Ultrasensitive AMH -Elisa-
- Inhibina B -Elisa-



www.elisa.co.uk



www.molecularmd.com



www.biovision.com



www.insitus.com



www.alpco.com



www.salimetrics.com



www.quidel.com



www.ebioscience.com



www.diasource-diagnostics.com



www.asuragen.com