

Expresión en microalga de una vacuna multi-epítipo contra el *Andes orthohantavirus*: un enfoque bioinformático

Daniel Misael Garza-García^a, José María Viader-Salvadó^a, Martha Guerrero-Olazarán^a, Luis Jesús Galán-Wong^a, Juan A. Gallegos-López^{a*}

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

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

Palabras clave: *Andes orthohantavirus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Chlamydomonas reinhardtii*, epítipo, vacunología inversa

Introducción

El *Andes orthohantavirus* (ANDV) es un hantavirus patógeno del género *Orthohantavirus* perteneciente a la familia *Hantaviridae*. La infección a humanos ocurre través del contacto con excreciones de roedores salvajes infectados y es el único hantavirus con la capacidad de transmitirse de persona a persona. El ANDV se localiza en la región de Sudamérica y es responsable del síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) que puede ser fatal y a la fecha no existe una vacuna o medicamento efectivo que haya sido aprobado por la US FDA contra este virus¹⁻². Las microalgas como sistema de expresión ofrecen importantes ventajas como altos niveles de expresión, alta estabilidad genética, mayores tasas de crecimiento, escalabilidad y bajo costo. Así mismo, la secuencia nucleotídica del péptido multi-epítipo (PM) se optimizó y se clonó *in silico*, para expresarse en *Chlamydomonas reinhardtii* como una vacuna con potencial para estimular una respuesta inmunológica contra el *Andes orthohantavirus*.

Metodología

La secuencia de la glicoproteína (segmento M) del *Andes orthohantavirus* se obtuvo del Banco Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Se realizó la predicción de la localización transmembrana de la glicoproteína mediante el servidor TMHMM v. 2.0. La secuencia aminoacídica de la glicoproteína se analizó con las herramientas de predicción de epítopos de células β de la Base de Datos Epítipo Inmune (IEDB, por sus siglas en inglés) mediante los análisis de inmunogenicidad, antigenicidad, hidrofiliidad, accesibilidad, giro β y flexibilidad. Se diseñó un péptido multi-epítipo uniendo los epítopos identificados utilizando la secuencia aminoacídica EAAAK como enlazador de tipo helicoidal. Luego, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y de alergenicidad. Se realizó la predicción de la estructura secundaria y terciaria, mediante los servidores SOPMA y I-TASSER, respectivamente. Así mismo, se realizó el refinamiento de la estructura con el servidor GalaxyRefine y la validación del modelo estructural mediante el análisis de Ramachandran con el servidor PROCHECK, la confirmación de los resultados se realizó mediante el servidor MolProbity. Posteriormente, se realizó la optimización de codones de la secuencia nucleotídica para la expresión en *Chlamydomonas reinhardtii*. Además, se realizó la predicción de la vía de expresión y sublocalización celular del PM con los servidores SLP-Local y Predictprotein. Finalmente, la secuencia optimizada del PM fue clonado *in silico* río abajo del promotor *alcA* en el vector de expresión *Algevir* de *Agrobacterium Tumefaciens*.

Resultados y discusión

En este estudio se identificaron los epítopos: QPAHTYD y PSSSSYSY en la glicoproteína del ANDV. Ambos epítopos fueron candidatos a vacuna al ser inmunogénicos, antigénicos, hidrofílicos, accesibles, flexibles y en giro β . En el diseño de vacunas un péptido multi-epítipo permite potenciar la respuesta inmunológica e incrementar la eficacia protectora de la vacuna. Además, el péptido multi-epítipo mostró 40 residuos de aminoácidos, un peso molecular de 4.0 KD, fue estable, soluble, no se consideró alergénico y no mostró similitud con proteínas humanas. Adicionalmente, se optimizó la secuencia nucleotídica del PM para su expresión en *Chlamydomonas reinhardtii* la cual se clonó *in silico* en el vector *Algevir*. La construcción del vector fue nombrada pAlgevir-PM. Así mismo, se predijo la vía de expresión y sublocalización celular del PM. La metodología en este estudio es similar a la empleada por Ramírez y cols. quienes en el 2019 expresaron una proteína quimérica con características de vacuna en microalga.

QPAHTYDEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKPSSSSYSY

Fig. 1. Secuencia aminoacídica del péptido multi-epítipo.

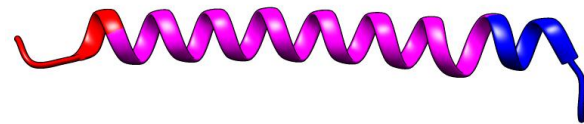


Fig. 2. Estructura tridimensional del modelo del péptido multi-epítipo. En color rojo la secuencia del epítipo QPAHTYD, color morado la secuencia de unión y en azul el epítipo PSSSSYSY. Visualización por UCSF Chimera.

Conclusiones

En este estudio, se diseñó por primera vez mediante herramientas de la bioinformática un péptido multi-epítipo como vacuna para expresarse en microalga con el potencial de estimular una respuesta inmunológica contra el *Andes orthohantavirus*. No obstante, para determinar la eficacia y seguridad de la vacuna, deberán realizarse estudios adicionales *in vitro* e *in vivo*.

Referencias

- Ramírez, J.; Arce, A.; González, O.; Mendoza, S. Intern. J. of Bio. Macrom. **2019**, 147, 46-52.
- Medina, R. A.; Perez, F.; Galeno, H.; Navarrete, M.; Vial, P.; Palma, E.; Ferrer, M.; Cook, J.; Hjelle, B. Journal of Virology. **2009**, 83, 2446-245