

# DESARROLLO *IN SILICO* DE UNA VACUNA PARA SU EXPRESIÓN EN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* CONTRA GOLDEN REPTARENAVIRUS QUE AFECTA SERPIENTES

Alondra Lizeth Ríos-Soltero<sup>1</sup>, Rafael Emilio Aburto-Ordóñez<sup>1</sup>, Citlaly Montserrat Lara-González<sup>1</sup>, Fernanda Núñez-García<sup>1</sup>, Verónica Yáñez-Ramírez<sup>1</sup>, Luis Jesús Galán-Wong<sup>1</sup>, Juan Antonio Gallegos-López<sup>1\*</sup>

1. Instituto de Biotecnología; Facultad de Ciencias Biológicas; Universidad Autónoma de Nuevo León; 66455; San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

\* Correspondencia: juan.gallegosp@uanl.edu.mx, Tel: +52 812-6068-507

## Resumen

El reptarenavirus es un virus de la familia *Arenaviridae* que provoca la enfermedad de cuerpos de inclusión en *Boidae* y *Pythonidae* (BIBD). En este estudio se diseñó una vacuna conservada contra variantes de Golden reptarenavirus para expresarse en *Chlamydomonas reinhardtii*. Para esto se realizó un alineamiento múltiple con secuencias de glicoproteína (GP) de variantes del reptarenavirus para identificar regiones conservadas. Las regiones conservadas se analizaron con herramientas del IEDB para predecir un PCV y su secuencia de DNA se optimizó con codones preferenciales de *C. reinhardtii*. La secuencia optimizada se ligó *in silico* en el plásmido pCAMBIA2300. Se obtuvo un PCV conservado de 12 aminoácidos de la GP en cinco variantes del reptarenavirus. Además, se obtuvo el plásmido pCAMBIA2300-PCV de 9,125pb portador de la secuencia optimizada codificante del PCV. En este estudio se diseñó por primera vez un PCV con potencial para estimular una respuesta inmunológica contra el reptarenavirus.

**Palabras clave:** Golden Reptarenavirus; *Chlamydomonas reinhardtii*; *Agrobacterium tumefaciens*; serpientes.

## Abstract

Reptarenavirus is a virus of the *Arenaviridae* family that causes *Boidae* and *Pythonidae* inclusion body disease (BIBD). In this study, a conserved vaccine against Golden reptarenavirus variants was designed to be expressed in *Chlamydomonas reinhardtii*. For this, a multiple alignment was performed with glycoprotein (GP) sequences of reptarenavirus variants to identify conserved regions. The conserved regions were analyzed with IEDB tools to predict a PCV and their DNA sequence was optimized with preferential codons of *C. reinhardtii*. The optimized sequence was ligated *in silico* into plasmid pCAMBIA2300. A PCV of 12 amino acids of GP conserved in five variants of the reptarenavirus was obtained. In addition, the 9,125bp plasmid pCAMBIA2300-PCV carrying the optimized sequence coding PCV was obtained. In this study, a PCV with the potential to stimulate an immune response against reptarenavirus was obtained for the first time.

**Keywords:** Golden Reptarenavirus; *Chlamydomonas reinhardtii*; *Agrobacterium tumefaciens*; snakes.

## INTRODUCCIÓN

El reptarenavirus es un virus de la familia *Arenaviridae*. El nombre de la familia proviene del término latín “arena” (en español “arena”) debido a la apariencia granular de las partículas virales. Esta familia se caracteriza por tener un genoma lineal de ARN de cadena simple. Se encuentra en Europa, Asia, África y América. Algunos de estos virus son transmisibles al humano, el primer registro de un arenavirus fue el virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), aislado en 1933 que ocasiona una meningitis no bacteriana. Los arenavirus se transmiten durante embarazo, al contacto con orina, saliva y sangre [1].

El genoma del arenavirus se compone de dos segmentos de ARN y cuatro proteínas: la polimerasa L, responsable de la replicación y transcripción del genoma viral; la proteína de matriz Z, una proteína pequeña que inhibe la actividad de la polimerasa L; la nucleoproteína NP que se une al ARN y forma un complejo ribonucleoproteico esencial para la replicación viral; y la glicoproteína (GP), un elemento membranal necesario para la entrada del virus a las células hospedadoras y que desempeña un papel crucial en la patogénesis [2].

La enfermedad de cuerpos de inclusión en boas (BIBD, por sus siglas en inglés) es una patología provocada por el reptarenavirus, que infecta a los miembros de las familias *Boidae* y *Pythonidae*. La sintomatología se caracteriza por alteraciones en el sistema nervioso central, opistótonos, parálisis, rigidez y dificultad de movimiento. Uno de los diagnósticos más precisos se realiza por medio de análisis microscópico de tejidos, al presenciarse inclusiones intracitoplasmáticas [3].

*Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga verde eucarionte, que ha sido empleada como vector de expresión debido a su rápida reproducción y adaptabilidad a distintos ambientes. Esta alga presenta una morfología ovoide de 10  $\mu\text{m}$  de largo por 3 de ancho, con dos flagelos lofótricos. Puede ser autótrofo o heterótrofo, según la disponibilidad de luz y alimento en su medio de crecimiento. La inserción de un plásmido se puede realizar tanto en el núcleo celular como en el único cloroplasto que posee, el cual tiene aproximadamente 80 copias de su genoma. Anteriormente, se empleó este organismo para la producción de una vacuna contra *Staphylococcus aureus* por Dressen y colaboradores en 2010 [4].

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* es empleada para crear plantas recombinantes. Esta bacteria emplea el plásmido Ti con el gene foráneo para transformar a la planta. La planta portadora del transgén pueda producir la proteína recombinante. Este mismo enfoque puede aplicarse a las microalgas para que produzcan proteínas recombinantes [5].

A la fecha, no existe una vacuna aprobada contra el reptarenavirus y las opciones terapéuticas y tratamientos para BIBD son limitados, lo que convierte al virus en un objetivo para el desarrollo de vacunas debido a su gran letalidad y fácil contagio. En las últimas décadas, la biotecnología ha permitido la creación de productos con propiedades antivirales por medio de reactores biológicos que funcionan como productores de proteínas recombinantes, de fácil cultivo y a bajo

costo. En el presente trabajo se diseñó *in silico* un PCV conservado para expresarse en *C. reinhardtii* contra el Golden reptarenavirus.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plataformas utilizadas

Se utilizaron las plataformas Viralzone (bajo la licencia Creative Commons Attribution 4.0 International CC BY 4.0 License SwissBioPics); Uniprot y UniProt Reference Clusters (UniRef); Immune Epitope Database & Tools (IEDB, NIH); European Bioinformatics Institute, Clustal  $\Omega$  (EMBL-EBI); BlastP (NCBI); Bacterial and Bioinformatics Resource Center; GenBank (NIH); Phyre2 V2.0; PDB Swiss Viewer v4.1 y GenScript.

### Dispositivos utilizados

1. HP Laptop 15-da0xxx Intel® Pentium® CPU 4417U @ 2.30GHz 2.30 GHz RAM 8.00 GB.
2. Galaxy Tab S8+ SM-X800NZAAXAR Snapdragon 8 Gen 1 1x2.995GHz Cortex-X2.
3. Huawei MateBook X EUL-W19P | Intel Core i5-10xxx i5-10210U 1,6GHz RAM 8.00 GB.

### Obtención de secuencias de GPs de variantes del reptarenavirus

Para el diseño de la vacuna se seleccionó la GP del reptarenavirus, ya que el virus utiliza esta proteína para poder entrar en la célula del hospedador y los anticuerpos producidos en respuesta a la GP impedirían la entrada del virus. De la base de datos del GenBank se obtuvieron las secuencias de la GP de variantes del Golden reptarenavirus (no. de acceso: J7HBH4.1), variante Rotterdam (AGH06039.1), variante Commune (YP\_009508467.1), variante Giessen (AZI72598.1) y variante California (AKH49222.1).

### Alineamiento múltiple de secuencias de GPs y selección del PCV

Para determinar las regiones conservadas en secuencias de GPs se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustal omega el cual se alimentó con secuencias de GPs de variantes de Golden reptarenavirus. Las regiones conservadas de GPs se analizaron mediante herramientas del IEDB para verificar que fueran accesibles, inmunogénicas, hidrofílicas, en giro  $\beta$ , antigénicas y flexibles mediante un puntaje (score) igual o mayor al umbral (threshold). Las regiones conservadas que mostraron todas estas características al mismo tiempo fueron consideradas PCV. Adicionalmente, la secuencia de la GP del virus se comparó con proteínas de miembros de la familia *Boidae* y *Pythonidae* mediante el programa BlastP.

### Modelamiento de la estructura 3D de la GP del reptarenavirus

Se modeló la estructura tridimensional de la GP del reptarenavirus con el servidor en Phyre2. Para lo cual, dicho servidor se alimentó con la secuencia de la GP del reptarenavirus (no. de acceso del GenBank: J7HBH4.1) y se seleccionó el mejor modelo. A continuación, mediante el programa Swiss Pdb Viewer se visualizó la estructura 3D de la GP y se determinó la ubicación y la accesibilidad del PCV.

**Tabla 1. Análisis del péptido candidato a vacuna.** Los distintos análisis se obtuvieron por medio de EIDB. La posición es respecto a los 427 aminoácidos que conforman la GP. Los aminoácidos resaltados corresponden al PCV.

Análisis	Posición	Péptido	Longitud	Aminoácidos del PCV
Inmunogenicidad	236-263	NMLTHHSPALSSGSKVDNTLEPGCDSNV	28	12
Giro $\beta$	239-252	THHSPALSSGSKVD	14	9
Accesibilidad	247-255	SGSKVDNTL	9	9
Antigenicidad	241-246	HSPALS	6	3
Flexibilidad	242-263	SPALSSGSKVDNTLEPGCDSNV	22	12
Hidrofilicidad	241-263	HSPALSSGSKVDNTLEPGCDSNV	23	12

#### Optimización y clonación de la secuencia del PCV

Se optimizó la secuencia nucleotídica del PCV con los codones preferenciales de *C. reinhardtii* mediante la plataforma GenScript. La secuencia optimizada se ligó en el vector de transformación de *A. tumefaciens*, mediante sitios de restricción en marco de lectura con un promotor, codón de inicio y de paro.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Predicción del Péptido Candidato a Vacuna

Los análisis de la secuencia aminoacídica de la GP con los programas del IEDB mostraron 39 péptidos inmunogénicos, 37 péptidos en giro  $\beta$ , 13 péptidos accesibles, 27 péptidos flexibles y 12 péptidos

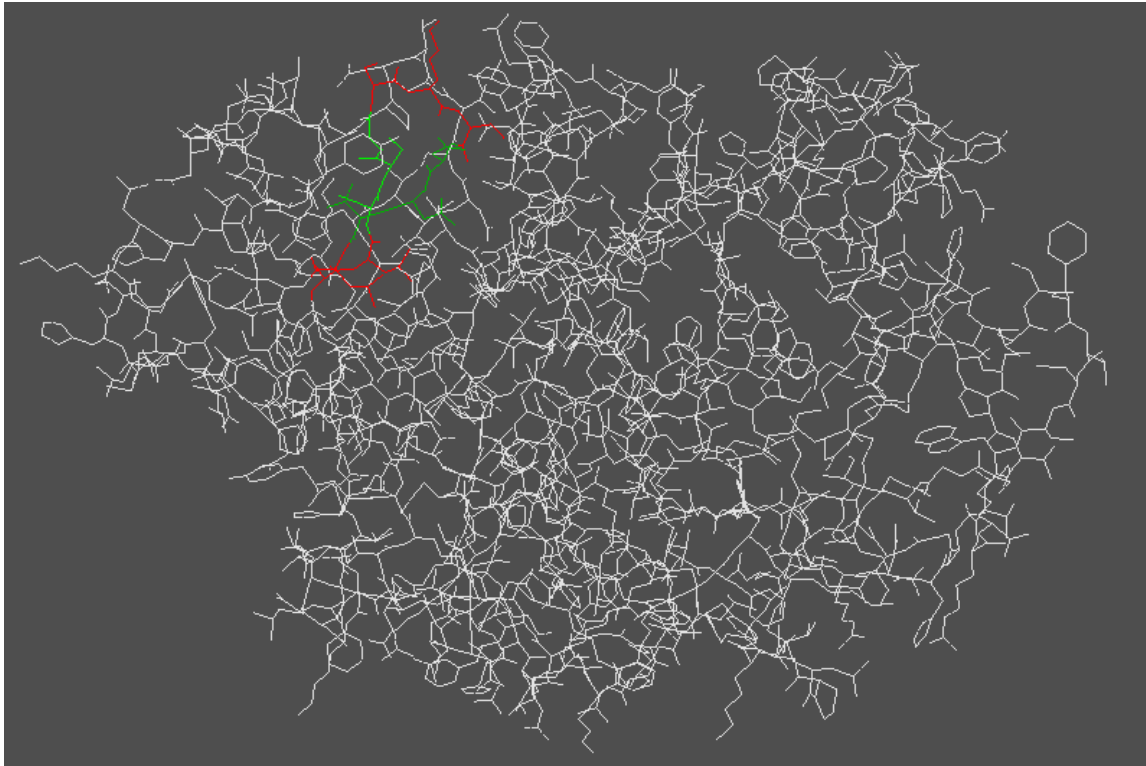
antigénicos y 39 péptidos hidrofílicos (Tabla 1). Se seleccionó el péptido ALSSGSKVDNTL, de la posición 243 al 255 de la secuencia de la GP, el cual fue considerado péptido candidato a vacuna por contar con las características al mismo tiempo y por estar conservado en las secuencias de GPs de las variantes del reptarenavirus empleadas para el alineamiento (Figura 1).

#### Comparación de la GP con proteomas de miembros de las familias Boidae y Pythonidae

El programa del BlastP no encontró similitud entre la glicoproteína viral y el proteoma de algún miembro de la familia *Boidae* y *Pythonidae*.

Accesibilidad	-	L	-	S	-	G	S	-	-	-	-	K	V	D	N	T	L
Flexibilidad	A	L	S	S	-	G	S	-	-	-	-	K	V	D	N	T	L
Hidrofilia	A	L	S	S	-	G	S	-	-	-	-	K	V	D	N	T	L
Giro	A	L	S	S	-	G	S	-	-	-	-	K	V	D	-	T	L
Antigenicidad	A	L	-	S	I	-	S	Q	L	E	H	-	V	-	-	T	-
Inmunogenicidad	A	L	S	S	-	G	S	-	-	-	-	K	V	D	N	T	L
Glicoproteína	A	L	S	S	-	G	S	-	-	-	-	K	V	D	N	T	L

**Figura 1. Péptido conservado por alineamiento.** Se realizó el alineamiento mediante Clustal  $\Omega$  y se realizó un acomodo manual en Antigenicidad. Se seleccionó el PCV según el alineamiento de las regiones.



**Figura 2. Estructura proteica tridimensional.** El PCV se encuentra resaltado. Las regiones en verde corresponden a aminoácidos accesibles y las regiones en rojo a los no accesibles.

#### Estructura 3D de la GP

En la Figura 2 se muestra el modelo teórico de la estructura 3D de la GP, así como el PCV del cual 6 de 12 aminoácidos se encontraron accesibles en la superficie de la proteína según el visualizador de proteínas Swiss PDB viewer.

#### Optimización del PCV

La optimización del PCV se realizó mediante GenSmart Optimization. El programa arrojó un contenido de G-C de 66.67%, y un contenido de A-T del 33.33%. A la secuencia del PCV se le agregó un codón de inicio y un codón de paro dando un total de 42 pb. La secuencia optimizada fue la siguiente AUGGCGCTGTCGTCCGGCAGCAAGGTGGACAACACCCTGTAA.

#### Plásmido de expresión

En la Figura 3 se observa el plásmido de expresión obtenido pCAMBIA 2000-PCV con 9,125 pb portador de la secuencia nucleotídica que codifica para el PCV (en color amarillo) en marco de lectura con el promotor CaMV 35S del virus del mosaico de la coliflor (en amarillo) y el terminador CaMV polyA (señal de poliadenilación del CaMV).

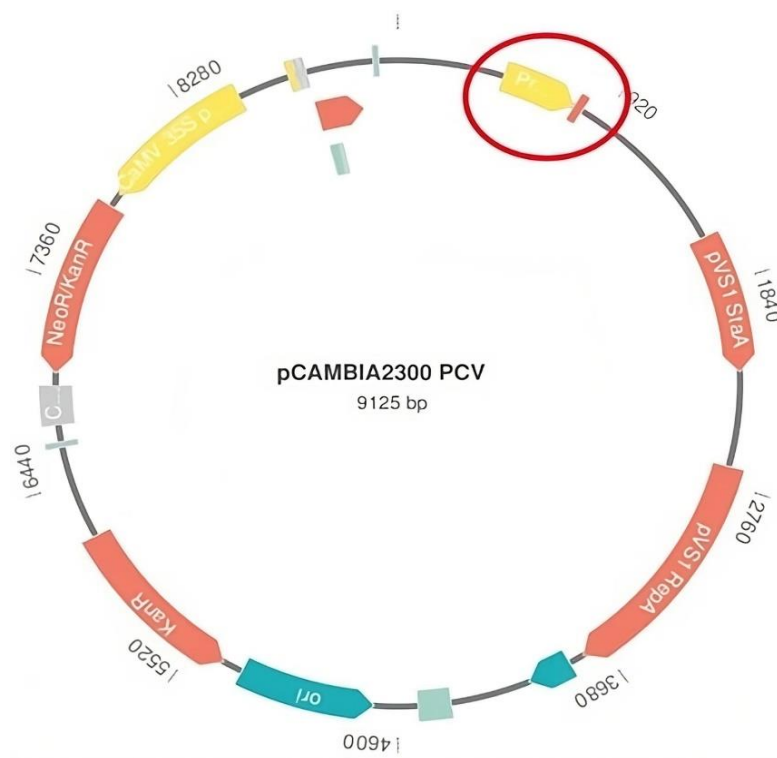
#### Discusión

El análisis del Reptarenavirus ha sido el foco de investigaciones orientadas al desarrollo de vacunas. A pesar de ello, actualmente no

existe una vacuna para evitar la infección por este virus. Esta carencia se debe a su naturaleza no letal en humanos, afectando exclusivamente a reptiles. No obstante, se han llevado a cabo estudios que se centran en emplear el genoma del virus como un vehículo para la creación de vacunas. La respuesta protectora contra numerosas cepas virales es posible por epítomos altamente conservados.

En base a este enfoque se emplearon secuencias de diferentes variantes del virus para la predicción de epítomos conservados hacia los virus de la familia *Arenaviridae*. La metodología empleada en este estudio fue similar a la que uso Azim y colaboradores quienes en el 2021 desarrollaron *in silico* una vacuna candidata contra virus de familia *Arenaviridae* [7].

Debido a que el PCV seleccionado resultó estar conservado en GPs de variantes del reptarenavirus, el PCV podría proteger contra variantes del virus al mismo tiempo. Así mismo, el alga *C. reinhardtii* portadora del PCV podría emplearse para alimentar y vacunar al mismo tiempo a las serpientes y evitar emplear agujas y jeringas para vacunarlas. Además, por expresarse el PCV en el alga *C. reinhardtii* no se necesitará de una cadena de frío para la conservación de la vacuna [8,9].



**Figura 3. Plásmido con gen insertado.** La secuencia del promotor (amarillo) y del gen que expresa el PCV (rojo anaranjado) están en una región separada de otros genes. LB y RB son los bordes izquierdo y derecho del T-DNA; ori es el origen de la replicación; MCS es el sitio de clonación múltiple.

## CONCLUSIONES

En este estudio se diseñó por primera vez *in silico* una vacuna con potencial para montar una respuesta inmunológica contra el Golden Reptarenavirus y sus variantes. Adicionalmente, la optimización de la secuencia nucleotídica codificante del PCV con los codones preferenciales de *Chlamydomonas reinhardtii*, permitirá la eficiente expresión del PCV.

No obstante, se requerirán de más estudios *in vitro* e *in vivo* para verificar la eficacia de la vacuna.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses en la publicación de este artículo.

## REFERENCIAS

- [1] Bentim Góes, L., Fischer, C., Almeida Campos, et al. Highly Diverse Arenaviruses in Neotropical Bats, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* (2022). 28(12), 2528-2533. <https://doi.org/10.3201/eid2812.220980>.
- [2] Burri, D. J., Pasqual, G., Rochat, C., Seidah, N. G., Pasquato, A., & Kunz, S. Molecular Characterization of the Processing of Arenavirus Envelope Glycoprotein Precursors by Subtilisin Kexin Isozyme-1/Site-1 Protease. *Journal of Virology* (2012). 86(9), 4935-4946. doi: 10.1128/jvi.00024-12
- [3] Chang, L.-W., & Jacobson, E. R. Inclusion Body Disease, A Worldwide Infectious Disease of Boid Snakes: A Review. *Journal of Exotic Pet Medicine* (2010). 19(3), 216-225. doi: 10.1053/j.jepm.2010.07.014
- [4] Dwivedi P, S. L. Alam and R. S. Tomar "Secretome, surfome and immunome: emerging approaches for the discovery of new vaccine candidates against bacterial infections" *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (9): 2016, 155, <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2107-3>
- [5] Rivera Solís, Rodrigo & Peraza, Santy & Herrera, Virginia. La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Revista Ciencia* (2011).
- [6] Rosales-Campos, A. L. and Gutiérrez-Ortega, A. Agrobacterium-mediated Transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi Leaf Explants. (2019). Bio-101: e3150. DOI: 10.21769/BioProtoc.3150.
- [7] Azim, K. F., Lasker, T., Akter, R., et al. (2021). Combination of highly antigenic nucleoproteins to inaugurate a cross-reactive next generation vaccine candidate against Arenaviridae family. *Heliyon* (2021). 7(5), e07022. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07022
- [8] Rasala, B. A., Muto, M., Lee, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology*

Journal (2010). 8(6), 719–733. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x

[9] Dubey, K. K., Luke, G. A., Knox, C., Kumar, P., Pletschke, B. I., Singh, P. K., & Shukla, P. (2018). Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools. *Briefings in functional genomics*, 17(5), 295-307