

BÚSQUEDA DE EPÍTOPES CONFORMACIONALES EN LA PROTEÍNA HPV16-E7 DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

Julio C. Calvo¹, Katia C. Chocontá², Juan C. Martínez², Óscar Orozco³, María M. Bravo⁴,
Luz M. Salazar¹, Carmen G. Granados¹, Nubia F. Barrera¹, Fanny Guzmán¹, Arnold C. Satterthwaite⁴,
Manuel E. Patarroyo¹

Aceptado: Junio/2000

Keywords: Conformational epitopes, helix structure, loop structure, epitope mapping, HPV16-E7 protein, cervical cancer.

RESUMEN

El virus de papiloma humano tipo 16 (HPV-16) es la principal causa de cáncer entre las mujeres en Colombia. Es importante desarrollar pruebas de bajo costo y confiables para detectar la presencia de este virus en las primeras etapas de la enfermedad. Los péptidos pueden ser usados para detectar anticuerpos en sueros, pero a menudo no son activos. Sin embargo, péptidos restringidos que imiten epítopos conformacionales pueden ser más efectivos. La predicción de las características estructurales de la oncoproteína HPV16-E7, según el algoritmo de Garnier, muestra tres estructuras en α -hélice y una estructura en bucle. Con el fin de identificar epítopos conformacionales en la oncoproteína HPV16-E7, se tomaron sueros de pacientes con carcinoma cervical invasivo que presentaron alguna reac-

ción en ensayos preliminares de ELISA con péptidos lineales, y se ensayaron contra péptidos restringidos conformacionalmente. Un péptido con restricción conformacional a α -hélice presentó una fuerte reacción con los sueros de pacientes con carcinoma cervical invasivo y ninguna reacción con sueros de mujeres sanas. Estos resultados preliminares indican que, al usar péptidos con restricción conformacional, se puede incrementar la reacción antígeno-anticuerpo e identificar marcadores para pruebas sencillas de diagnóstico de HPV-16.

ABSTRACT

Human papillomavirus types 16 (HPV-16) is the major cause of cancer among women in Colombia. It is important to develop reliable inexpensive tests for the presence of this virus as a prelude to early intervention. Peptides can be used to detect antibodies in sera but are often inactive. However, constrained peptide mimics of conformational epitopes could be more active. Structural fea-

1 Instituto de Inmunología, Hospital San Juan de Dios, Universidad Nacional de Colombia, Av. 1 No. 10 - 01, Bogotá, Colombia. *A quien se debe enviar la correspondencia.

2 Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

3 Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá.

4 The Burnham Institute, La Jolla, CA 92037, USA.

tures of the HPV16-E7 oncoprotein as predicted by the algorithm of Garnier show three α -helical structures and a loop-like structure. In order to identify conformational epitopes on the HPV16-E7 oncoprotein, sera from women with invasive cervical carcinoma which showed any reactivity with linear peptides were tested against conformationally restricted peptides. One peptide which was conformationally restricted to an α -helix showed a strong positive reaction with sera from women with invasive cervical carcinoma, and no reaction with sera from healthy women. These preliminary results indicate that by using a conformationally restricted peptide, it is possible to achieve significant improvements in the antigen-antibody reaction. It also identifies a simple diagnostic test for HPV-16.

Abreviaturas: Fmoc, 9-fluorenil-metoxicarbonilo; t-Boc, t-butoxicarbonilo; O, Orn, ornitina; BSA, albúmina sérica bovina; ELISA, ensayo inmunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay); PBS, tampón salino de fosfato.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical es la causa principal de cáncer en la mujer en los países del tercer mundo. En un alto porcentaje de carcinomas cervicales se ha detectado el genoma del virus de papiloma humano, HPV, asociándose la infección de este virus con el desarrollo de cáncer. Los HPV (tabla 1) son pequeños virus de DNA que infectan las células epiteliales e inducen lesiones en la piel y en el tejido mucoso del cuello uterino. La mayoría de los carcinomas cervicales contienen y expresan secuencias de HPV tipo 16 y 18, considerados de alto riesgo (1, 2).

La oncoproteína viral E7 es considerada como factor clave en la aparición de tumores (3-4). En un trabajo previo se realizó un barrido de la oncoproteína HPV16-E7 por medio de 13 péptidos lineales sobrelapados en 14 residuos y se encontró reactividad en sólo dos de los péptidos con sueros de pacientes con cáncer cervical. El péptido lineal entre los residuos 1-20 presentaba reacción (con 9% de los sueros), mientras que el siguiente

Tabla 1. Enfermedades asociadas al virus de papiloma humano (HPV).

Tipo de HPV	Enfermedad
2, 4, 29, 57	Verruga vulgaris
1, 2, 4, 10	Verruga plantaris y plana
5, 8, 19-25, 36, 46, 47, 50	Epidermodisplasia verruciforme
6, 11, 42, 54	Condiloma acuminato anogenital
16, 18, 30, 31, 33-35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 56, 58	Neoplasia intraepitelial, carcinoma cervical
30, 40	Lesiones orales, carcinoma de laringe
27	Verrugas cutáneas (pacientes trasplante renal)

Tabla 2. Péptidos lineales y con restricción conformacional de la proteína HPV16-E7 y un control negativo de una proteína de malaria sintetizados.

Péptido	Restricción	Secuencia	Posición
J-058	hélice-1	JLAZ-TLHEYMLDLQ-GGG	7-16
J-066	hélice-1	DAO- LHEYMLDLQ-C	8-16
J-030	lineal-1	MHGDTPTLHEYMLDLQPETT-C	1-20
J-059	hélice-2	JLAZ-QLNDSSEEEDEI-GGG	27-38
J-071	lineal-2	QLNDSSEEEDEI	27-38
J-051	bucle	VTFCKCDSTLRRCVQ	55-70
J-070	lineal-bucle	VTFCKCDSTLRRCVQ	55-70
890	lineal	RLCVQSTHVDIRTLLEDLLMG	66-85
J-040	Control (-)	GYSLFQKEGMVLNEGTSFTA	Malaria

se purificaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) y se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (17). El modelo de Satterthwait (sitio de nucleación JLAZ-) ha demostrado su efectividad para estabilizar secuencias con tendencia a formar α -hélice en estudios estructurales y antigénicos (9-10). Nuestro grupo probó en este trabajo el sitio de nucleación DAO, del cual se están llevando a cabo estudios de tendencia estructural por difracción circular.

Prueba de ELISA. Los péptidos sintetizados se probaron contra cinco sueros de mujeres con cáncer cervical (sueros 471, 1061, 1072, 1126, 1180) que asisten al Instituto Nacional de Cancerología, y cinco sueros de mujeres con citología normal (sueros 215, 216, 234, 257, 259). Los sueros se trabajaron en diluciones de 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 y 1/6400 en BSA del 1% en PBS. Se utilizó como segundo anticuerpo anti γ -IgG peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluida

1/5000 en BSA del 1% en PBS-Tween. Las lecturas de densidad óptica se llevaron a cabo en un titulador de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con lo observado en los cromatogramas analíticos y confirmado por espectrometría de masas, se obtuvo el producto con la secuencia esperada en cada uno de los casos. Por medio del ensayo de ELISA se determinó si había reconocimiento de los sueros de pacientes con cáncer cervical y se comparó además la reactividad hacia péptidos con restricción conformacional con respecto a la reactividad hacia sus homólogos lineales. Ninguno de los sueros de mujeres sanas presentó reactividad en ELISA con los péptidos lineales o con restricción conformacional.

Los resultados de la prueba de ELISA se muestran en la figura 2. Se observa un incremento muy significativo en la reactividad al restringir la estructura en la re-

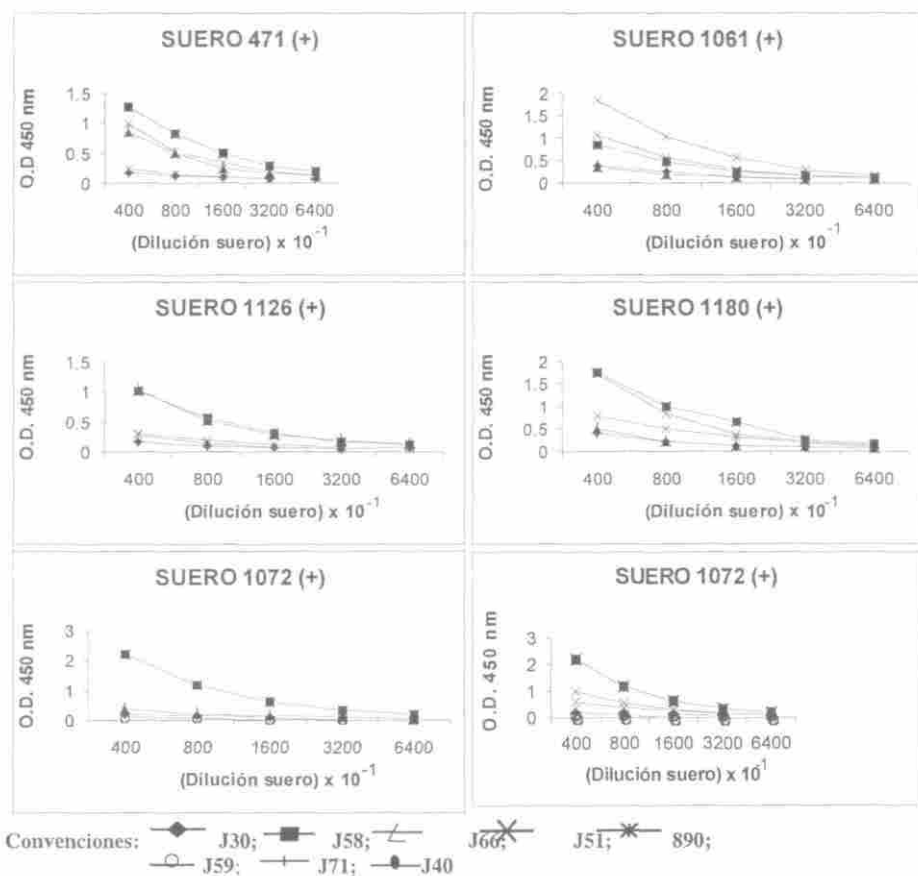


Figura 2. Títulos de los sueros 471, 1061, 1126, 1180 y 1072 de pacientes con cáncer cervical, contra péptidos lineales (J-30, J-71, 890 de HPV y J-40 de malaria), y con restricción conformacional a hélice (J-58, J-66, J-59) y a bucle (J-51).

gión de los residuos 1-20. Mientras el péptido lineal (J-30) presenta una reactividad muy baja, su homólogo estructurado (hélice 1 JLAZ-, péptido J-58) presenta una reactividad fuerte en ELISA. El otro homólogo estructurado (hélice 1 DAO, péptido J-66) presenta reactividad fuerte sólo con un suero. En la región de la segunda hélice no hubo reacción con el péptido lineal ni con su homólogo estruc-

turado. En la región de la estructura en bucle el péptido lineal (J-70) no presentó reacción alguna y su homólogo estructurado (J-51) solo fue reactivo con dos sueros. El péptido lineal 890 (residuos 66-85) presentó fuerte reactividad con cuatro de los sueros. Este péptido, que contiene en su secuencia (predicción por el algoritmo de Garnier) una hebra β (residuos 66-70) y un α -hélice (residuos 75-83), no

tenía su homólogo estructurado. El péptido de malaria (J-40), como se esperaba, no presentó reacción alguna.

De los resultados obtenidos se ve la necesidad de realizar un estudio puntual de la secuencia del péptido 890, con un péptido que reproduzca simultáneamente las dos estructuras o dos péptidos cortos que imiten cada una de ellas para establecer la existencia o no de epítopes conformacionales en esa región. Además, en la región de los residuos 1-20, se observa que un gran incremento en la antigenicidad puede ser logrado al usar péptidos espacialmente restringidos, y que la secuencia de la hélice 1 contiene un epítipo conformacional. Este incremento en la reactividad puede tener utilidad en la identificación de marcadores para pruebas de diagnóstico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestra gratitud al Ministerio de Salud, República de Colombia, por la financiación de este trabajo.

REFERENCIAS

- Villa, L. L. (1997). Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv. Cancer Res.* **71**, 321-341.
- Zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**, F55-78.
- Munger, K.; Phelps, W. C. (1993). The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1155**, 11-123.
- Bravo, M. M.; Cóbbita, A. L.; Orozco, O. (1994). Virus del papiloma: cáncer de cuello uterino. *Innovación y Ciencia* **3**, 48-54.
- Bravo, M. M.; Cóbbita, A. L.; Mesa, M.; Martínez, G.; Varela, A.; Montes, V.; Orozco, O. Human serum antibodies against human papillomavirus type 16 E7 defined by synthetic peptides and recombinant protein (en preparación).
- Satterthwait, A. C.; Arrhenius, T.; Hagopian, R.; Zavala, F.; Nussen-zweig, V.; Lerner, R. (1988). Conformational restriction of peptidyl immunogens with covalent replacements for the hydrogen bond. *Vaccine* **6**, 99-103.
- Calvo, J. C.; Satterthwait, A. C. (2000). Identificación de un epítipo conformacional en el extremo carboxilo de la proteína MSP-1 de *P. falciparum*. *Rev. Colomb. Quim.* **29** (en este mismo número).
- Satterthwait, A. C.; Cabezas, E.; Calvo, J. C.; Wu, J.; Wang, P. L.; Cheng, S. Q.; Kaslow, D. C.; Livnah, O.; Stura, E. A. (1996). Constrained synthetic peptide vaccines. In: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology; Proceedings of the 14th American Peptide Symposium*. (Eds: Kaumaya, P. T.; Hodges, R. S.), ESCOM, Leiden, The Netherlands, pp. 772-773.
- Cabezas, E.; Satterthwait, A. C. (1999). The hydrogen bond mimic

- approach: solid-phase synthesis of a peptide stabilized as an α -helix with a hydrazone link. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3862-3875.
10. Chiang, L. C.; Cabezas, E.; Calvo, J. C.; Satterthwait, A. C. (1993). The conformational restriction of synthetic peptides to the alpha helix, reverse turn and loops with covalent hydrogen bond mimics. In: *Peptides: Biology and Chemistry; Proceedings of the Chinese Peptide Symposium 1992*. (Ed: Du, Y.C.), ESCOM, Leiden, The Netherlands, pp. 204-206.
 11. Merrifield, R. B. (1963). Solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2153.
 12. Houghten, R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5131-5135.
 13. Calvo, J. C.; Barrera, N. B.; Garcia, J. A.; Guzman, F.; Espejo, F.; Patarroyo, M. E. (1999). Síntesis de la oxitocina en fase sólida usando tert-butoxicarbonilo y fluorenilmetoxi-carbonilo derivados. *Rev. Colomb. Quim.* **28**, 19-25.
 14. Choconta, K. C. (1997). *Estudio de epítopes de la proteína E7 del virus de papiloma humano tipo 16, HPV16-E7: síntesis de tres péptidos con restricción conformacional y examen de su antigenicidad*. Tesis. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.
 15. Granados, C. G. (1999). *Diseño y síntesis de un modelo que pueda ser utilizado como sitio de nucleación para la síntesis de péptidos con restricción conformacional a hélice*. Tesis. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.
 16. Zimmer, S.; Hoffmann, E.; Jung, G.; Kessler, H. (1993). Head-to-tail cyclization of hexapeptides using different coupling reagents. *Liebigs Ann. Chem.*, 497-501.
 17. Calvo, J. C.; Guzmán, F.; Alba, M. P.; Torres, E.; Vanegas, M.; Trujillo, M.; Patarroyo, M. E. (1999). Detección de formación de imidas en péptidos sintéticos por espectrometría de masas MALDI-TOF. *Rev. Colomb. Quim.* **28** (2) (en prensa).