

IDENTIFICACIÓN DE UN EPÍTOPE CONFORMACIONAL EN EL EXTREMO CARBOXILO DE LA PROTEÍNA MSP-1 DE *P. FALCIPARUM*

Julio C. Calvo^{1,2*}, Arnold C. Satterthwait²

Aceptado: Junio/2000

Keywords: Malaria, MSP-1 protein, 19 kDa protein, *Plasmodium falciparum*, Conformational epitopes, Cysteine-rich domain, synthetic malaria vaccine.

RESUMEN

El fragmento carboxilo terminal, rico en cisteínas, de la proteína 1 de superficie del merozoito (MSP-1) desempeña un papel importante en la invasión del merozoito de la malaria al eritrocito. Anticuerpos contra esta región de MSP-1 inhiben la invasión. La identificación de secuencias peptídicas que sean reconocidas por anticuerpos antiproteína MSP-1, puede ser un punto de partida para el desarrollo de vacunas. Se sintetizó una serie de péptidos lineales que abarcaban la totalidad de la secuencia de los dominios del extremo carboxilo de la proteína MSP-1, para ser ensayados con un suero de conejo antiproteína MSP-1, la cual fue extraída de la cepa FCR3 de *P. falciparum*. No se observó ninguna reacción con los péptidos lineales en el ensayo de ELISA. Sin embargo, péptidos cíclicos correspondientes a los bucles B de los dos dominios tipo EGF del fragmento carboxilo terminal reaccionaron con el suero de conejo. Esto

indica que péptidos restringidos conformacionalmente pueden ser usados para identificar anticuerpos contra epítopes conformacionales que no pueden ser detectados con péptidos lineales, lo cual tiene una significancia práctica general.

ABSTRACT

The cysteine-rich C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 (MSP-1) plays an important role in the invasion of erythrocytes by malaria merozoites. Antibodies to this region of MSP-1 have been shown to inhibit invasion. Identification of peptide sequences that are recognized by MSP-1 antibodies could therefore be a starting point for vaccine development. A series of overlapping linear peptides spanning the entire length of the C-terminal domains of MSP-1 were synthesized and used to screen rabbit antiserum that was raised against MSP-1 from the FCR3 strain of *P. falciparum*. No reaction of the antiserum was observed with the linear peptides in ELISA. However, cyclic peptides corresponding to the B-loops of the two EGF-like domains of the C-terminal fragment reacted with the rabbit antiserum.

1. Instituto de Inmunología, Hospital San Juan de Dios, Universidad Nacional de Colombia, Av. I No. 10 - 01, Bogotá, Colombia. *A quien se debe enviar la correspondencia: jccalvo@burnham-inst.org

2. The Burnham Institute, 10901 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA.

This indicates that constrained peptides can be used to identify antibodies to conformational epitopes that can not be identified with linear peptides which could have general practical significance.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria que aflige a unos 270 millones de individuos anualmente y es la causante directa de al menos dos millones de muertes al año, especialmente en niños menores de cinco años. En estas últimas décadas se ha observado que el parásito ha desarrollado múltiple resistencia a las drogas, y el desarrollo de una vacuna ha llegado a ser una prioridad para el control y erradicación de la enfermedad. El parásito de la malaria, el plasmodium, presenta un ciclo de vida complejo en dos hospederos, el hombre y el mosquito, en cada uno de los cuales pasa por varios estadios con características antigénicas diferentes.

El parásito es transmitido al hombre, en la forma de esporozoito, por la hembra del mosquito anopheles. Después de entrar al torrente sanguíneo, el esporozoito invade las células del hígado y evoluciona a la forma merozoito e invade los glóbulos rojos. El merozoito, procedente de las células del hígado o de un glóbulo rojo, puede infectar glóbulos rojos adyacentes. Algunos merozoitos evolucionan a formas sexuales o gametos, los cuales son ingeridos por el mosquito. Una vez en el mosquito, los gametos se fusionan para formar un cigoto, el cual se alarga para formar un ooquinetto. El ooquinetto penetra las paredes del estómago del mosquito y se transforma en un oocito, el cual da lugar a miles de esporozoitos. Cuando se

rompe el oocito, los esporozoitos migran a las glándulas salivares del mosquito, en donde pueden ser inyectados en el hospedero humano completándose el ciclo.

Las investigaciones se han centrado en la determinación de aquellas proteínas de superficie del plasmodium que son importantes en el proceso de una respuesta inmune protectora (1). Sólo pequeños fragmentos de las proteínas generan respuesta inmunológica; estos son los denominados determinantes antigénicos o epítopes. El precursor del mayor antígeno de superficie del merozoito, referido aquí como MSP-1, se sintetiza durante la fase esquizogónica del parásito y está presente como un complejo de fragmentos derivados por procesos proteolíticos. A un fragmento de 83 kDa del extremo amino-terminal le siguen los fragmentos de 30 kDa, 38 kDa y 42 kDa. Este último se subdivide en un fragmento de 30 kDa y un fragmento de 19 kDa, rico en cisteína, del extremo carboxilo-terminal. Existe evidencia de que el fragmento de 19 kDa es llevado por el parásito dentro del glóbulo rojo y que anticuerpos contra este fragmento pueden inhibir la invasión (2-5).

La proteína MSP-1, en el extremo carboxilo (fragmento de 19 kDa), presenta dos dominios con una estructura similar al factor de crecimiento de la epidermis, conocidos como dominios tipo EGF (*Epidermal Growth Factor*) (6). El dominio tipo EGF está presente en un amplio espectro de proteínas extracelulares con una gran variedad de funciones en los procesos biológicos, tales como el desarrollo y crecimiento celular, la adhesión celular y la coagulación de la sangre (7). Este dominio contiene entre 40-50 residuos de aminoácido y seis cisteí-

nas formando tres enlaces disulfuro (cisteínas 1-3, 2-4 y 5-6). Estos enlaces disulfuro inducen y estabilizan un manojo de 3 a 4 estructuras en bucle, denominadas bucle A, bucle B, bucle C y bucle D. La predicción de estructura por medio del algoritmo GORBTURN de las secuencias del fragmento de 19 kDa de la proteína MSP-1 para las cepas K-1 y FC-27 de *Plasmodium falciparum* (figura 1), mostró que los bucles B de los dominios EGF-1 y EGF-2 eran los más prominentes y estaban más expuestos al solvente, lo cual los convertía en potenciales blancos de una respuesta de anticuerpos. Resultados cristalográficos recientes confirmaron las estructuras predichas y aportaron elementos de distancia antes desconocidos (8).

MAb 302, específico contra los dominio tipo EGF de la proteína MSP-1 del parásito de malaria de roedores *Plasmodium yoelii*, puede proteger ratones de la infección por inoculación del parásito (10). El epítipo reconocido por el anticuerpo MAb 302 fue localizado en el primer dominio tipo EGF de la proteína MSP-1, es dependiente de la formación de los enlaces disulfuro y es discontinuo (11). Sin embargo, algunos resultados sugieren que los dos dominios tipo EGF son necesarios para generar una respuesta protectora *in vivo* (12). Con el fin de identificar la posible existencia de epítopos conformacionales continuos en los dos dominios tipo EGF de la proteína MSP-1, se sintetizaron péptidos lineales y con restricción conformacional a la estructura en bucle,

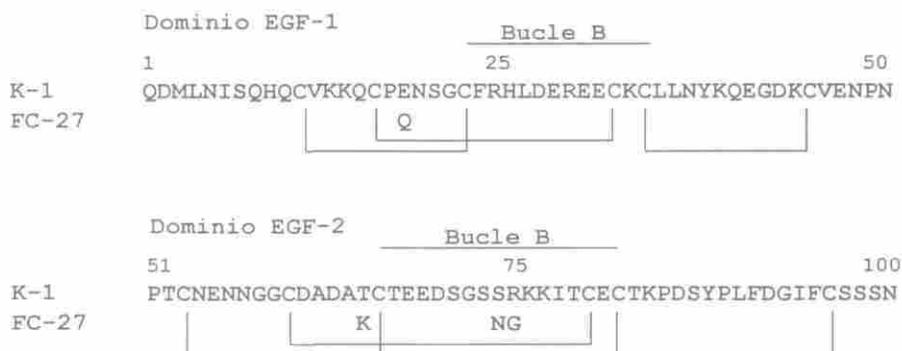


Figura 1. Secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína MSP-1 de las cepas K-1 y FC-27 de *Plasmodium falciparum*, que muestra los enlaces disulfuro. Las secuencias correspondientes a los bucles B están indicadas.

El fragmento carboxilo terminal de 19 kDa de la proteína MSP-1 es altamente conservado en el *Plasmodium*, ya sea el que infecta a humanos, a primates o a roedores (9). El anticuerpo monoclonal

por medio de mimos covalentes de los puentes de hidrógeno (13-14). La base teórica de este enfoque se basa en qué péptidos constreñidos a imitar la estructura tridimensional de los epítopos de mala-

ria deberán servir como mejores antígenos e inmunógenos, toda vez que la reacción antígeno-anticuerpo se presume que se incrementará significativamente cuando se alcance la complementaridad espacial. Anticuerpos generados contra péptidos estructurados deben, presumiblemente, ser más específicos y unirse más fuertemente a la proteína complementaria.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de los ligandos. El ligando J (ácido 5,5-dimetoxi-1-pentanoico) se sintetizó como metiléster en tres pasos de acuerdo con la metodología des-

con fuerza. Luego se adicionó HCl 1 N hasta pH 3, se separó la fase orgánica y se llevaron a cabo dos extracciones más en fase líquida con acetato de etilo. Las fracciones de acetato de etilo se combinaron y se adicionó $MgSO_4$ por 25 min. La solución se filtró, se rotaevaporó y el residuo oleoso (ligando J) se dejó al vacío por 5 min. El ligando Z (ácido [(1-propilideno-2-Fmoc)hidracino] acético) se sintetizó de acuerdo con la metodología descrita por Cabezas y Satterthwait (16). Las estructuras de los ligandos J y Z se muestran en la figura 2.

Síntesis de los péptidos. Se sintetizaron 10 péptidos lineales de 20 residuos que comprendían los residuos 1-19, 10-28, 19-37, 28-46, 37-55, 46-64, 55-73, 64-82, 73-91, 82-100 (véase figura 1), más un residuo de cisteína en su extremo carboxilo, y 4 péptidos cíclicos correspondientes a las estructuras en bucle B de los dominios EGF1 y EGF2 para las cepas FC-27 y K-1. La síntesis se llevó a cabo en un sintetizador múltiple de péptidos ACT 350 (Advanced Chemtech, Louisville, KY, USA) por la estrategia Fmoc de síntesis de

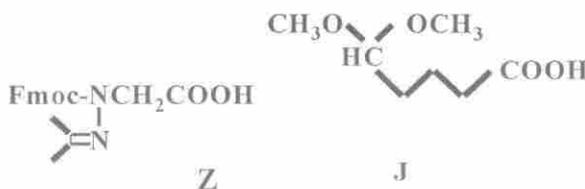


Figura 2. Fórmula estructural de los ligandos J y Z utilizados en la síntesis de péptidos cíclicos (estructuras en bucle) usando un enlace de hidrazona como mímico de puente de hidrógeno.

crita por Stevens y Lee (15). Para la hidrólisis de J-metiléster se adicionó 1 g (0.00568 mol) de J-metiléster a una disolución que contenía 0.3038 g (0.00757 mol) de NaOH disueltos en 10 ml de metanol/agua 1:1, y se dejó en reacción por 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se rotaevaporó, el residuo se disolvió en 20 ml de acetato de etilo, se adicionaron 5 ml de agua fría y se agitó

péptidos en fase sólida (17-18) sobre una resina Rink MBHA (0.47 meq/g, Novabiochem, San Diego, CA, USA). Para la síntesis de péptidos con restricción conformacional a bucle, se introdujeron los ligando J y Z en los extremos de la secuencia correspondiente a la estructura en bucle (figura 3). Debido a la dificultad para acoplar la glicina que le sigue al ligando Z en la secuencia, ésta se acopló como cloruro de acilo. A la resina se le

adicionó una disolución que contenía 3 equivalentes (con respecto a la resina) de Fmoc-Gly-Cl disueltos en NMP, se agitó por 1 min, luego se adicionaron 6 equivalentes de DIEA y se dejó en reacción por 15 min. Una vez finalizada la síntesis con los ligandos J y Z en los extremos de la secuencia, la resina-péptido se empacó en bolsas de tela de poli-propileno para su ciclización.

Las bolsas se sumergieron en una disolución que contenía 2 equivalentes (con respecto a la resina) de HCl 4N en dioxano (Pierce, Rockford, IL, USA) disueltos en 10% TFE / DCM (15 ml por bolsa de 100 mg de resina), y se dejaron en reacción por 15 min. La disolución se desechó y las bolsas se lavaron 5 veces con DCM y se secaron. La desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y la liberación del péptido de la resina se llevó a cabo con dos disoluciones: para los péptidos lineales se utilizó una disolución que contenía 92,5% TFA, 2,5% agua, 2,5% EDT y 2,5% TIS, y para los péptidos cíclicos, una disolución que contenía 95% TFA y 5% agua, siguiendo procedimientos ya descritos (17).

Caracterización de los péptidos. Los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), en una columna C18-AR cosmosil semipreparativa (20 x 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) y las fracciones recogidas analizadas por RP-HPLC, en una columna analítica RP-18 Lichrosorb (4 x 250 mm; Merck, Darmstadt, Alemania), con un gradiente de 20-60%B en 40 min para la columna

semipreparativa y de 0-100%B en 15 min para la columna analítica, a una longitud de onda de 210 nm. El solvente A es 0,1% TFA en agua y el B, 0,1% TFA en acetonitrilo. Para confirmar la identidad de los péptidos se usó un espectrómetro de masas tipo FAB.

J-TEEDSGSSRKKIT-GZG-NH-Resin



HCl / TFE / DCM, 15 min

J-TEEDSGSSRKKIT-GZG-NH-Resin

Figura 3. Síntesis en fase sólida de un péptido cíclico (con estructura en bucle) haciendo uso de un mimo de puente de hidrógeno representado en un enlace hidrazona entre J y Z.

Acoplamiento de los péptidos a BSA. Para llevar a cabo las pruebas de ELISA, los péptidos se acoplaron a maleimida-BSA activada (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Se prepararon disoluciones acuosas de los péptidos (5 mg/ml) y de maleimida-BSA activada (10 mg/ml). A 10 l de la disolución de péptido se adicionaron 10 l de la disolución de maleimida-BSA y 20 l de una disolución tampón de acoplamiento de maleimida (Pierce), y la mezcla se dejó en reacción por 2 horas. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por RP-HPLC, inyectando 25 l una muestra que contenía 4 l de la mezcla de reacción, 2 l de una disolución acuosa de DMF (1 l/ml) como control interno y 22 l de agua.

Prueba de ELISA. Para llevar a cabo la prueba de ELISA, se utilizaron los péptidos unidos a maleimida-BSA activada siguiendo el protocolo del productor (Pierce). Como primer anticuerpo se usó el suero policlonal de conejo R294 anti-proteína MSP1. Este suero fue obtenido por Perkins (Rockefeller University, Nueva York, N.Y., EE.UU.) al inyectar conejos con la proteína MSP-1 purificada, proveniente de la cepa FCR3 de *Plasmodium falciparum*. Se usaron diluciones del suero anti-MSP-1 de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800. Como segundo anticuerpo se usó anti-IgG (H+L) de conejo producido en cabras, purificado y acoplado a una fosfatasa alcalina (Pierce). Para la detección se usó como sustrato de la fosfatasa el p-nitrofenilfosfato disódico (la reacción genera una coloración amarilla). El resultado se leyó en un titulador de ELISA a una longitud de onda de 415 nm. Como blanco se utilizó una línea de la placa de ELISA sin péptido y se tomó como resultado positivo para cada dilución (título) una diferencia en la densidad óptica 0.2 con respecto al blanco. Se realizaron dos ensayos: uno con los péptidos lineales comprendiendo la totalidad de la secuencia del fragmento de 19 kDa y otro ensayo

con los péptidos con restricción conformacional a bucle.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, se llevó a cabo un ensayo de ELISA con los péptidos lineales, pero no se observó reacción alguna del suero policlonal de conejo R294 anti-proteína MSP-1. Estos péptidos tenían sus secuencias sobrelapadas y cubrían toda la región del extremo carboxilo terminal de la proteína. Los resultados obtenidos con los péptidos lineales indicaban que si en el suero de conejo R294 anti-proteína MSP-1 había anticuerpos policlonales contra el fragmento carboxilo terminal, éstos se habían formado contra epítopes conformacionales. Para el segundo ensayo de ELISA se tomó como control uno de los péptidos lineales ensayados inicialmente, el cual contenía la secuencia correspondiente al bucle B del segundo dominio tipo EGF (EGF-2), el cual era el más protuberante y, por tanto, el más expuesto (figura 1) a cualquier respuesta de anticuerpos. Los péptidos con restricción conformacional a bucle utilizados se muestran en la tabla 1. Como en el primer dominio tipo EGF, la secuencia en la región del bucle B es común a las dos cepas

Tabla 1. Conjugados péptido-BSA utilizados para el segundo ensayo de ELISA. Los corchetes cuadrados indican la parte ciclizada con el enlace de hidrazona.

Secuencia	Estructura	Dominio / alelo
[J-TEEDSGSNGKKIT-GZ]C-BSA	bucle	EGF2 / K1
[J-TEEDSGSSRKKIT-GZ]C-BSA	bucle	EGF2 / FC27
[J-FRHLDEREE-GZ]C-BSA	bucle	EGF1 / FC27, K1
[J-FRHLDEREE-GZ]GGCG-BSA	bucle	EGF1 / FC27, K1
Ac-ATCTEEDSGSSRKKITCECC-BSA	lineal	EGF2 / FC27

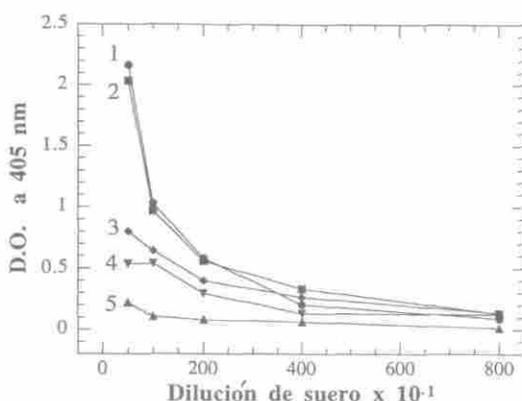


Figura 4. Títulos del suero R294 antiproteína MSP-1 contra los bucles B del dominio tipo EGF2 de las cepas K-1 (1) y FC-27 (2) de *P. falciparum*, el bucle B del dominio EGF1 sin (3) y con espaciadores (4), y el péptido lineal (5).

de *P. falciparum* analizadas (FC-27 y K-1), se decidió sintetizar este bucle con tres aminoácidos como espaciadores para evaluar cualquier posible diferencia en el ensayo de ELISA.

El suero de conejo R294 antiproteína MSP-1 mostró una reacción positiva fuerte con los péptidos cíclicos correspondientes al bucle B del dominio EGF-2, de los alelos FC27 y K1, con densidades ópticas (DO) mayores a 2,0 a una dilución del suero de conejo de 1/50 (figura 4). La reacción del suero R294 con los péptidos cíclicos correspondientes al bucle B del dominio EGF-1, con y sin aminoácidos espaciadores, fue débil (DO 0,5-0,7 a la misma dilución), y casi nula (DO \leq 0,2) con el control lineal. Además, el suero preinmune, es decir, el suero de conejo antes de inocularle la proteína MSP-1, no mostró reacción alguna con los péptidos lineales ni con los péptidos cíclicos.

La importancia de lo observado radica en que se pueden alcanzar significativos

incrementos en la antigenicidad por medio del plegamiento de péptidos con mimos covalentes de los puentes de hidrógeno, tal como los usados en este trabajo. Teniendo en consideración que los péptidos lineales no mostraron reacción alguna con el suero policlonal R294, mientras que sus contrapartes plegadas sí lo hicieron, este enfoque sintético de crear mimos estructurales puede ser un medio para la identificación de anticuerpos que definan epítopos conformacionales en la proteína MSP-1 de *P. falciparum*.

A pesar de que generalmente se considera que los epítopos conformacionales son discontinuos, estos resultados demuestran que epítopos conformacionales continuos pueden estar incluidos en secuencias cortas de aminoácidos. Los métodos sintéticos que se han desarrollado y empleado en este trabajo para el plegamiento de péptidos con enlaces de hidrazona como mimos de puentes de hidrógeno, así como los métodos desarrollados por

otros grupos para el plegamiento de péptidos, permitirá explorar este fenómeno con una gran amplitud en un futuro cercano. Las consecuencias prácticas de este ensayo llevan a la identificación de nuevos epítopes neutralizantes y de secuencias estructuradas candidatas a vacunas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Margaret Perkins de la Rockefeller University, New York, NY 10021-6399, USA, por facilitar el suero de conejo anti-proteína MSP-1. Este proyecto recibió el apoyo financiero de la Agency for International Development (DPE-5979-A-00-1035-00), to A.C.S.

REFERENCIAS

1. Patarroyo, M. E. (1989). El desarrollo de una vacuna antimalárica. *Tribuna Médica* **80**, 52-65.
2. Holder, A. A. (1988). The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunology. *Prog. Allergy* **41**, 72-97.
3. McBride, J. S.; Heidrich, H. G. (1987). Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**, 71-84.
4. Blackman, M. J.; Heidrich, H.G.; Donachie, S.; McBride, J. C.; Holder, A. A. (1990). A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J. Exp. Med.* **172**, 379-382.
5. Burns, J. M.; Majarian, W. R.; Young, J. F.; Daly, T. M.; Long, C. A. (1989). A protective monoclonal antibody recognizes an epitope in the carboxyl-terminal cysteine-rich domain in the precursor of the major merozoite surface antigen of the rodent malarial parasite, *Plasmodium yoelii*. *J. Immunol.* **143**, 2670-2676.
6. Blackman, J. M.; Ling, I. T.; Nicholls, S. C.; Holder, A. A. (1991). Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 29-34.
7. Campbell, I. D.; Bork, P. (1993). Epidermal growth factor-like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 385-392.
8. Chitarra, V.; Holm, I.; Bentley, G. A.; Petres, S.; Longacre, S. (1999). The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol. Cell* **3**, 457-464.
9. Daly, T. M.; Burns, J. M.; Long, C. A. (1992). Comparison of the carboxy-terminal cysteine-rich domain of the merozoite surface protein 1 from several strains of *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**, 279-282.
10. Majarian, W. R.; Daly, T. M.; Weidanz, W. P.; Long, C. A. (1984).

- Passive protection against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **132**, 3131-3137.
11. Farley, P. J.; Long, C. A. (1995). *Plasmodium yoelii* 17XL MSP-1: fine-specificity mapping of a discontinuous, disulfide-dependent epitope recognized by a protective monoclonal antibody using expression PCR (E-PCR). *Exper. Parasitol.* **80**, 328-332.
 12. Calvo, P. A.; Daly, T. M.; Long, C. A. (1996). *Plasmodium yoelii*: the role of the individual epidermal growth factor-like domains of the merozoite surface protein-1 in protection from malaria. *Exper. Parasitol.* **82**, 54-64.
 13. Arrhenius, T.; Satterthwait, A. C. (1990). The substitution of an amide-amide backbone hydrogen bond in an α -helical peptide with a covalent hydrogen bond mimic. In: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology; Proceedings of the 11th American Peptide Symposium*. (Eds: Rivier, J.E.; Marshall, G.R.), ESCOM, Leiden, The Netherlands, pp. 870-872.
 14. Chiang, L. C.; Cabezas, E.; Calvo, J. C.; Satterthwait, A. C. (1993). The conformational restriction of synthetic peptides to the α -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.
 15. Stevens, R. V.; Lee, A. W. M. (1979). On the stereochemistry of the Robinson-Schopf Reaction. A stereospecific total synthesis of the ladybug defense alkaloids precoccinelline and coccinelline. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 7032-7035.
 16. 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.
 17. Calvo, J. C.; Barrera, N. F.; García, J. A.; Guzmán, F.; Espejo, F.; Patarroyo, M. E. (1999). Síntesis de la oxitocina en fase sólida usando tert-butoxicarbonilo y fluorenilmetoxicarbonilo derivados. *Rev. Colomb. Quím.* **28** (1), 19-25.
 18. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. (1997). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*, CRC Press, Boca Raton, FL.