

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCCA PIETRO CAMILLO DOS SANTOS

**ANÁLISE ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA P24 DE HIV-1
COM REGIÕES FAB DE DIFERENTES ANTICORPOS COMO ESTUDO
INICIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM DIAGNÓSTICO DE HIV-1**

CURITIBA

2016

**ANÁLISE ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA P24 DE HIV-1 COM REGIÕES FAB DE DIFERENTES ANTICORPOS
COMO ESTUDO INICIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM DIAGNÓSTICO DE HIV-1**

2016

LUCCA PIETRO CAMILLO DOS SANTOS

**ANÁLISE ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA P24 DE HIV-1 COM
REGIÕES FAB DE DIFERENTES ANTICORPOS COMO ESTUDO INICIAL PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM DIAGNÓSTICO DE HIV-1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina da Universidade Federal do
Paraná como requisito à obtenção do título de
obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina

Orientadora: Profa. Dra. Maria Berenice Reynaud
Steffens
Co-orientadora: Dra. Beatriz Gomes Guimarães

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, à Dra Beatriz Gomes Guimarães pela atenção, paciência e dedicação ímpar à orientação desse trabalho, fundamentais para o processo de aprendizado.

À profa. Dra Maria Berenice Reynaud Steffens e aos membros da banca avaliadora, pela atenção e dedicação à avaliação do projeto e do presente trabalho e pelas discussões e sugestões, também essenciais para o aprendizado.

Ao prof. Nilson Ivo Tonin Zanchin e aos colegas do Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, por sempre prezarem por um ambiente de trabalho acolhedor e que incite o pensamento crítico e contribua para o acesso a um amplo conhecimento dentro da área de proteínas e da pesquisa científica em geral.

RESUMO

O vírus HIV-1 possui uma grande variabilidade genética, tornando necessária a sua classificação em tipos e subtipos. O diagnóstico eficaz de HIV, de grande importância para combater a transmissão do vírus, deve não apenas incluir todos os subtipos predominantes em determinada região, mas também detectar a presença viral em diversas fases da infecção. A fase aguda (primeiras semanas de infecção) é crítica para o diagnóstico, uma vez que o hospedeiro ainda não produz anticorpos anti-HIV para serem reconhecidos por um teste de imunodiagnóstico de primeira geração. O uso de anticorpos contra partículas virais permite detectar a presença do vírus na fase aguda, uma vez que, durante essa fase, proteínas do envelope e do capsídeo viral podem ser capturadas a partir do sangue do hospedeiro. A bioinformática consiste-se em uma ferramenta importante para a análise da interação entre um anticorpo e o antígeno e os possíveis efeitos de substituições de resíduos na região de interação. O presente trabalho tem por objetivo analisar a interface de interação de diferentes estruturas conhecidas de fragmentos de anticorpos anti-p24 ligados ao antígeno, assim como avaliar as alterações ocasionadas pelas principais variações genotípicas de HIV-1. Os resultados obtidos indicaram pouca interferência das variações nas interfaces de interação. Notavelmente, os valores das áreas de interface sofreram alterações perceptíveis em alguns testes. Em alguns casos (e.g. reconhecimento do epítipo de HIV do subtipo F1 pelo FabA10F9), verificou-se a diminuição da área de interação antígeno-anticorpo, enquanto em outros (e.g. reconhecimento do epítipo de HIV do subtipo O pelo Fab25.3) o valor da área de interação aumentou. Todavia, com a análise dos testes controle da metodologia utilizada, que inclui plataformas disponíveis ao público de *docking* molecular e de análise de interfaces de interação, verificou-se que há limitações no método para a tomada de mais conclusões a respeito da alteração das variações do epítipo na formação dos complexos analisados.

Palavras-chave: HIV, p24, imunodiagnóstico, análise estrutural de proteínas, anticorpos

ABSTRACT

The virus HIV-1 has a wide range of genetic variability, which makes it necessary its classification into types and subtypes. The correct diagnosis is of great importance to combat the HIV transmission, and it has to include every prevailing subtypes in a certain region as well as be able to detect the virus in various phases of infection. The acute phase of infection (generally, first two weeks) is critical for the diagnosis, since the host has not yet produced antibodies against the virus, so they can't be detected with 'st generation immuno-essays. The use of anti-HIV antibodies allows for the detection of the virus during the acute phase, when proteins from the viral envelope and capsid can already be captured and detected from the host's blood. Bioinformatics are important tools for the analysis of antigen-antibody interaction and the possible effects caused by residue substitutions in the interacting region. This work's objective is to analyze the interfacing regions of varied anti-p24 with known structures bound to the p24 antigen as well as the effect caused by HIV-1 genotypical variation in these interactions. The results show very few interference of the variations in the interaction interfaces. More notably, the values of interface area showed more variation between some tests. In some cases, (e.g. F1 HIV-1 epitope being recognized by FabA10F9) there was loss in the total interface area, while in other cases (e.g. O HIV-1 epitope being recognized by Fab25.3), there was an increase in the total interface area. However, with the analysis of controls tests that were performed to validate the methodology, which included online molecular docking and interface analysis tools, we showed that there are limitations to the method that was used, impeding more thorough conclusions about the possible effects of the variations in the complexes formation.

Keywords: HIV, p24, imuno-diagnosis, protein structural analysis, antibodies

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. EPIDEMIOLOGIA E GENÉTICA DO HIV-1.....	8
1.2. DIAGNÓSTICO DE HIV-1.....	10
1.3. A PROTEÍNA P24.....	12
1.4. ANTICORPOS.....	14
1.5. ESTRUTURA E PROPRIEDADE DOS AMINOÁCIDOS.....	16
1.6. ANÁLISE ESTRUTURAL COMO FERRAMENTA PARA OTIMIZAÇÃO DE ANTICORPOS.....	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL.....	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. METODOLOGIA	22
3.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E LEVANTAMENTO DE ESTRUTURAS CONHECIDAS DE ANTICORPOS ANTI-P24.....	22
3.2. ANÁLISE DAS INTERFACES DE INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO.....	22
3.3. ENSAIOS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	23
3.4. ANÁLISE E MAPEAMENTO DA VARIABILIDADE DE EPÍTOPOS NA INTERFACE DE INTERAÇÃO.....	25
4. RESULTADOS	27
4.1. LEVANTAMENTO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS CONHECIDAS DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS ANTI-P24.....	27
4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS REGIÕES DE INTERAÇÃO ANTÍGENO- ANTICORPO.....	27
4.2.1. Análise – Fab13B5-p24.....	28
4.2.1.1. Fab13B5-p24 – Análise preliminar da estrutura.....	28
4.2.1.2. Fab13B5-p24 – Identificação dos pares de interação e análise da variabilidade do epítipo.....	30
4.2.1.3. Fab13B5-p24 – Ensaio de <i>docking</i> controles.....	32
4.2.1.4. Fab13B5-p24 – Ensaio de <i>docking</i> com variações no antígeno p24.....	33
4.2.2. Análise - Fab10AF9-p24.....	36
4.2.2.1. FabA10F9-p24 – Análise preliminar da estrutura.....	36
4.2.2.2. FabA10F9-p24 – Identificação dos pares de interação e variabilidade do epítipo.....	39

4.2.2.3. FabA10F9-p24 – Ensaio de <i>docking</i> controles.....	41
4.2.2.4. FabA10F9-p24 – Ensaio de <i>docking</i> com variações no antígeno p24.....	42
4.2.3. Análise – Fab25.3.....	44
4.2.3.1. Fab25.3 – Análise preliminar da estrutura.....	44
4.2.3.2. Fab25.3-p24 – Identificação dos pares de interação e variabilidade do epítopo.....	46
4.2.3.3. Fab25.3-p24 – Ensaio de <i>docking</i> controles.....	48
4.2.3.4. Fab25.3-p24 – Ensaio de <i>docking</i> com variações no antígeno p24.....	48
4.2.4. Análise - FabCB41.....	49
4.2.4.1. FabCB41-p24 – Análise preliminar da estrutura.....	49
4.2.4.2. FabCB41-p24 – Identificação dos pares de interação e variabilidade do epítopo.....	51
4.2.4.3. FabCB41-p24 – Ensaio de <i>docking</i> controles.....	51
4.2.4.4. FabCB41-p24 – Ensaio de <i>docking</i> com variações no antígeno p24.....	53
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA E GENÉTICA DO HIV-1

De acordo com dados apresentados no Boletim Epidemiológico de HIV, houve 25.384 novos casos registrados de AIDS no Brasil em 2013: sendo 95,7% decorrente de transmissão por relação sexual, 3,5% por uso de drogas injetáveis e 0,7% por transmissão vertical. Esses números representam um aumento de 8% em relação a 2006. A taxa de mortalidade também aumentou no mesmo período, de 5,9 para 6,4 casos para cada 100.000 habitantes (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014). A tendência encontrada no Brasil vai no sentido inverso à mundial, que descreve diminuição dos novos casos de AIDS e número de mortes registradas. Segundo estimativa da ONU, houve queda de 20% em novas infecções e de 35% no número de mortes relacionadas à AIDS, no mundo, entre 2006 e 2013 (UNAIDS, 2014). O Brasil é reconhecido como referência na política de tratamento da AIDS, porém a discrepância entre os números de infecção e mortalidade existente entre o Brasil e o mundo revela que fatores como conscientização da população e avanço do diagnóstico são igualmente importantes para conter a epidemia. Como ainda não há cura para a AIDS, o diagnóstico rápido e eficaz torna-se a principal arma contra a propagação da doença.

Avanços na detecção do vírus por meio de testes em fluidos corporais contribuem não apenas para aumentar o alerta da população infectada, impedindo a transmissão pelas vias principais, como também para realizar o controle de qualidade do sangue destinado às transfusões. De 2009 a 2014, houve 40 casos registrados de transmissão de HIV por transfusão sanguínea no Brasil, o que representa uma queda considerável quando comparados ao número de casos registrados no intervalo entre 2003 e 2008, que foi 131 (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014). Tal queda demonstra a eficácia de medidas tomadas pelo governo para melhorar a segurança de transfusões de sangue, como a obrigação por lei da realização de um teste baseado em ácidos nucleicos (NAT) para identificação de sangue contaminado com HIV, a partir do começo de 2014.

Diferenças genéticas em HIV-1 estabelecem diferentes grupos e subtipos. O grupo M consiste-se no grupo responsável pela epidemia de AIDS, enquanto os grupos N, O e P são encontrados raramente, em indivíduos infectados em regiões específicas da África. O grupo M subdivide-se em subtipos A, B, C, D, F, G, J e K. Ainda, vírus de diferentes genótipos, ao dividir o mesmo espaço geográfico, podem reproduzir-se dentro de um hospedeiro, levando ao aparecimento de novos subtipos de HIV com RNA recombinante,

denominadas formas recombinantes circulantes (CRFs, do inglês *circulating recombinant forms*) (Burke, 1997). Até 2005, haviam sido descritos no Brasil 9 subtipos conhecidos de HIV-1 do grupo M, que ocasiona a maioria dos casos de AIDS no mundo, sendo que ainda há considerável variação genética dentro desses subtipos. Somadas à diversidade filogenética já conhecida, novas sequências recombinantes de HIV-1 estão sendo descobertas ano a ano (Leitner *et al*, 2005). Tamanha variabilidade também facilita o surgimento de linhagens de HIV resistentes a certas formas de tratamento, uma vez que mutações que garantem resistência a drogas podem ser selecionadas com auxílio de supressão incompleta da reprodução viral (Clark *et al.*, 2007).

De acordo com o banco de dados mundial de sequências de HIV (Foley *et al.*, 2013), 68,7% dos vírus isolados de indivíduos infectados no Brasil correspondem ao subtipo B, 12,5% ao subtipo C e 8,6% ao subtipo F, enquanto de 8% a 10% se enquadram no grupo de formas recombinantes circulantes, principalmente BC e BF1 (Figura 1).

Em um estudo feito em 2013 no estado de São Paulo, foi observada uma prevalência de 38% da forma recombinante BF1 em adolescentes e crianças infectadas com HIV-1, o que pode indicar uma mudança na distribuição dos subtipos no Brasil (Sanabani, 2013). O surgimento de novas formas recombinantes e sua propagação na população consiste-se em um novo obstáculo para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico eficientes e baratos. Para a concepção de um teste de imunodiagnóstico para HIV-1 eficaz, é necessário que o anticorpo utilizado se ligue a proteínas de diversos subtipos de vírus. O conjunto de anticorpos e proteínas virais utilizado nos testes deve ser otimizado de modo a incluir todos os subtipos encontrados naquela região/país.

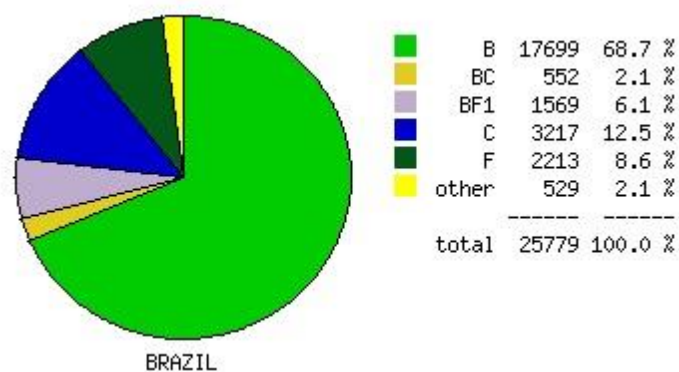


Figura 1: Gráfico de setores representando a distribuição dos subtipos de HIV-1 nas infecções registradas do vírus no Brasil. À direita, legenda atribuindo cores a cada subtipo, seguido do número total de casos registrados no país e a porcentagem relativa ao total de casos (Foley *et al.* Los Alamos HIV Database, 2015).

1.2. DIAGNÓSTICO DE HIV-1

A presença de HIV-1, tipo predominante do vírus e geralmente referido apenas como HIV, pode ser detectada em fluidos corporais de pessoas contaminadas por meio de três sinais: o material genético do vírus, proteínas virais ou anticorpos anti-HIV produzidos pelo hospedeiro. O teste com base em ácidos nucleicos (NAT, do inglês *nucleic acid test*) tem como objetivo identificar e quantificar a presença de RNA viral, através de uma reação de PCR, em que são utilizados *primers* que se ligam a sequências conhecidas de HIV-1. Desse modo, é possível não apenas diagnosticar a infecção, mas também acompanhar a evolução do tratamento (Gullett & Nolte, 2015). A limitação desse teste encontra-se no fato de o HIV-1 possuir grande variabilidade genética, tornando difícil a escolha dos *primers* para amplificação e aumentando a chance de um falso-negativo. Assim, para aumentar a precisão do diagnóstico, o NAT é realizado utilizando duas sequências conhecidas de HIV-1 como alvos de PCR (Chudy *et al.*, 2012), ou ainda, em conjunto com ensaios imunológicos.

Os testes NAT possuem altas exigências de custo, equipamentos, reagentes e pessoal qualificado, pois deve ser feita a extração de RNA do sangue do paciente, síntese de cDNA e reação de PCR quantitativo utilizando uma mistura de *primers* que se liguem a sequências conhecidas do material genético de diversos subtipos de HIV (Hans & Marwaha, 2014) e, portanto, são utilizados no Brasil apenas para a confirmação dos casos de infecção após a realização de testes prévios, como ensaios imunológicos. O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma alternativa mais barata e rápida para o diagnóstico de HIV-1, uma vez que se baseia apenas na utilização de anticorpos ligados a uma enzima ou radioisótopo para detectar proteínas.

Tanto anticorpos quanto antígenos podem ser detectados através do ELISA. Para capturar anticorpos, o antígeno é imobilizado em um poço de ensaio de ELISA e incubado com amostra contendo o anticorpo de interesse. A revelação pode acontecer de maneira direta, em que o anticorpo está diretamente ligado a uma enzima reveladora, ou indireta, em que, após a ligação do anticorpo primário, é adicionado um anticorpo secundário ligado à enzima de revelação, que se liga à porção Fc do primeiro anticorpo (Figura 2-A). Através da imobilização de anticorpos na placa do ensaio, também é possível capturar antígenos de interesse. Para a detecção do antígeno, é utilizado um anticorpo conjugado que se liga à porção exposta do antígeno, formando um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo (ELISA sanduíche) (Figura 2-B).

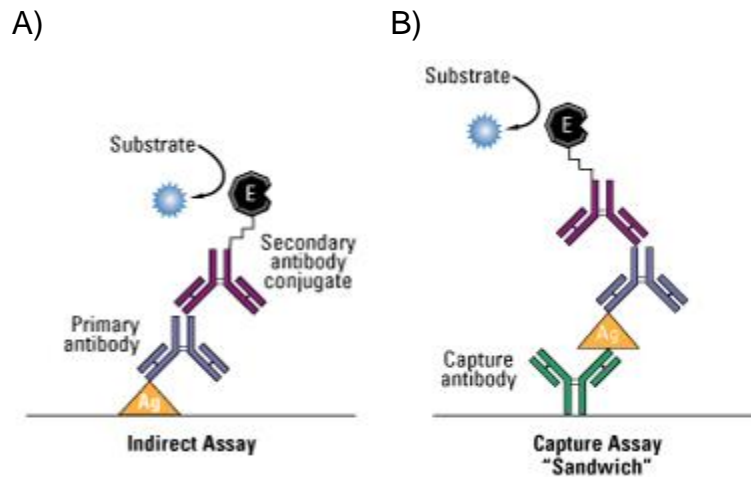


Figura 2: Figura esquemática dos tipos de ensaio ELISA. No ensaio indireto (A), um antígeno imobilizado é utilizado para detecção do anticorpo que será revelado por um anti-anticorpo ligado a molécula reveladora. No ensaio do tipo ELISA sanduíche (B), um anticorpo imobilizado é utilizado para capturar o antígeno, que é revelado por meio de outro anticorpo.

Testes de imunoenensaio são mais baratos e rápidos que os NAT, podendo-se ainda, por exemplo, utilizar um coquetel de antígenos virais (sintéticos ou provenientes de lisado de vírus) de vários tipos de HIV para capturar imunoglobulinas de resposta à infecção (Tiwari *et al.*, 2012). Em contrapartida, os imunoenensaio devem levar em conta a diversidade de antígenos de HIV-1 existentes, assim como as mudanças na composição do soro do hospedeiro no decorrer da infecção (Figura 3). Testes de 1ª e 2ª geração de imunoenensaio para AIDS possuem como alvo apenas anticorpos anti-HIV, portanto podem resultar em falso-negativo na fase aguda, quando o sistema imune do organismo ainda não começou a produzir anticorpos contra o vírus (Daskalakis, 2011).

Nas fases 1 e 2, correspondentes às primeiras semanas de infecção, há um aumento acentuado da concentração de vírus no sangue, acompanhado por um pico de proteína p24 (Figura 3). Nessa fase, é crítico que seja feito o diagnóstico eficaz, uma vez que ainda não há sintomas mas há grande potencial de transmissão.

A descoberta de diferentes fases de detecção levou ao desenvolvimento da 4ª geração de imunoenensaio. Além de antígenos de HIV (p24 e proteínas do envelope), esta nova geração de testes utiliza anticorpos anti-p24 fixados ao poço da placa de ensaio, de maneira a possibilitar a captura tanto de anticorpos quanto do antígeno p24 no plasma do paciente.

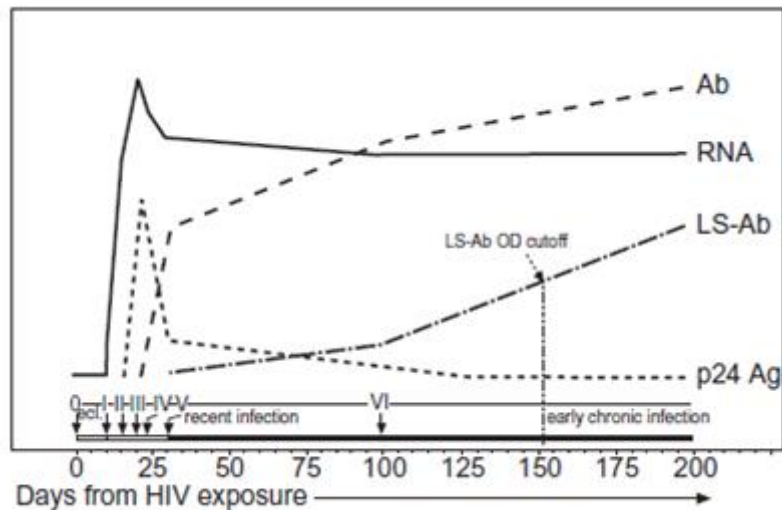


Figura 3: Gráfico da evolução da concentração de marcadores de infecção ao longo dos dias após exposição ao HIV. Ab: concentração de anticorpos anti-HIV produzidos pelo hospedeiro, Segundo Fiebig *et al.* (2003), a infecção por HIV-1 apresenta 6 fases detectáveis, sendo 1: presença de HIV no sangue somente detectado por RNA, 2: detecção de RNA e antígeno p24 (p24 Ag), uma proteína bem conservada em HIV-1, 3: detecção de RNA, antígeno e anticorpos anti-HIV (Ab), e 4,5 e 6: detecção de diferentes anticorpos e presença de bandas específicas de HIV-1 em *Western blotting*.

1.3. A PROTEÍNA P24

A proteína p24 forma o capsídeo que protege o material genético do HIV-1, sendo relativamente bem conservada em diversos subtipos do vírus e a proteína com menos variabilidade entre todas as proteínas de HIV (Figura 4). O antígeno p24 também é detectável em fluidos de indivíduos recém-infectados. Dessa maneira, a doença pode ser reconhecida tanto na fase aguda quanto nas fases seguintes (Daskalakis, 2011).

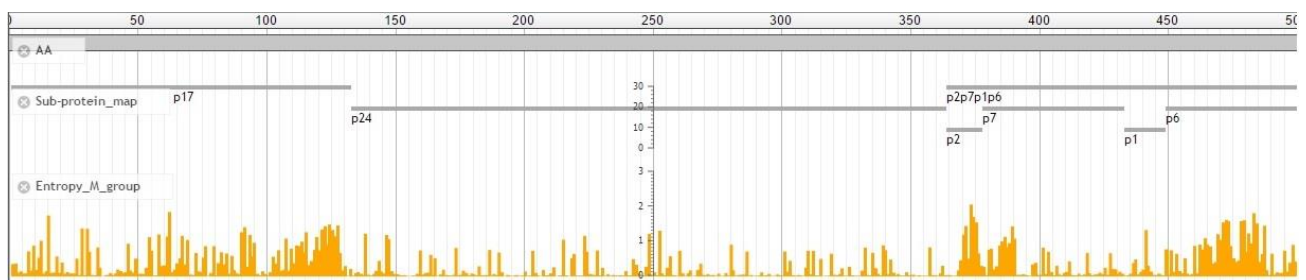


Figura 4: Representação do grau de variabilidade da sequência das proteínas codificadas pelo gene *Gag* de HIV-1, entre os subtipos do vírus HIV-1. As proteínas são identificadas pelas barras horizontais cinzas. Em laranja é mostrado o coeficiente de variabilidade ("Entropia de Shannon") por aminoácido, cujo valor é definido segundo Foley e colaboradores (Foley *et al.* 2013) e varia entre ~0,01 (muito conservado) e ~2,7 (altamente variável). O valor de entropia é calculado com base no alinhamento de genomas virais de

todo o grupo M de HIV-1. Destaca-se o menor grau de variabilidade da proteína p24, quando comparada com as demais proteínas Gag.

A proteína do capsídeo é formada a partir dos precursores codificados pelo gene *Gag*, que junto com *Pol* e *Env* formam o genoma do HIV-1. Enquanto o gene *Env* codifica proteínas do envelope viral e *Pol*, as enzimas chave da infecção, integrase, protease e transcriptase reversa, o gene *Gag* codifica demais proteínas que formam a estrutura do vírus, como a p24 (Domenech & Neira, 2013).

A determinação da estrutura tridimensional da proteína p24 mostrou que cada monômero possui dois domínios, o domínio C-terminal (CTD) e o domínio N-terminal (NTD), conectados por um *linker* flexível (Figura 5-A). Para a formação do capsídeo, que possui formato cônico, as proteínas p24 agrupam-se em hexâmeros (Figura 5-B). Os monômeros que formam esse hexâmero mantêm a estrutura das subunidades do capsídeo por meio de interações intermoleculares entre NTD-NTD, CTD-CTD e NTD-CTD, assim como interações CTD-CTD entre hexâmeros adjacentes (Domenech & Neira, 2013).

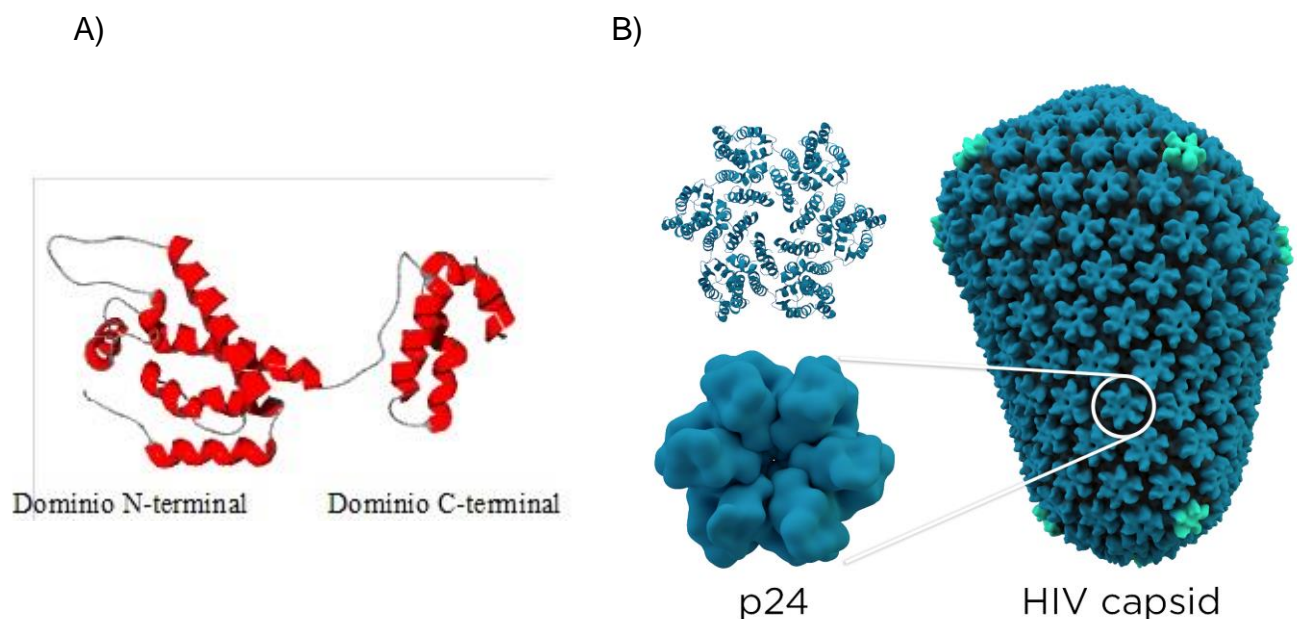


Figura 5: A) Representação da estrutura tridimensional de um monômero da proteína p24 de HIV-1 (Monaco-Malbet *et al.*, 2000. PDB: 1E6J). As estruturas em vermelho representam α -hélices. A proteína divide-se em domínios N-terminal e C-terminal, ligados por um linker flexível. B) Estrutura de hexâmeros de p24 e agrupamento de hexâmeros para formar o capsídeo viral (em formato cônico). (Gres *et al.* 2015, Zhao *et al.*, 2013)

Apesar de ser bem conservada, a proteína p24 possui variações em sua sequência de aminoácidos entre determinados subtipos de HIV-1. Foi demonstrado que a

substituição de um único aminoácido na sequência da proteína, que ocorre naturalmente em alguns subtipos de HIV-1, pode impossibilitar a ligação de um anticorpo anti-p24 específico ao epítipo em que ocorreu a mutação (Vetter *et al.*, 2015), o que se consiste em um obstáculo para a construção de anticorpos que consigam reconhecer antígenos de uma larga gama de subtipos de HIV-1.

1.4. ANTICORPOS

Anticorpos do tipo Imunoglobulina G (IgG) apresentam uma estrutura em forma de 'Y', sendo que a base representa a porção constante (Fc), que modula a resposta imune do organismo ligando-se a receptores e proteínas do sistema complemento, e os braços representam a porção reconhecedora de antígeno (Fab), onde o antígeno específico é ligado. Tipicamente, IgGs contêm duas cadeias pesadas idênticas, ligadas por pelo menos duas pontes dissulfeto, e duas cadeias leves idênticas, ligadas às pesadas por uma ponte dissulfeto. A extremidade da porção Fab, que se liga ao antígeno, é chamada de porção variável (Fv), pois apresenta uma grande variabilidade de estrutura terciária de um anticorpo para outro, permitindo que anticorpos IgG reconheçam uma larga gama de antígenos (Figura 6-A) (Janeway, 2001). A cadeia peptídica do antígeno que interage diretamente com o anticorpo que o reconhece é denominada epítipo.

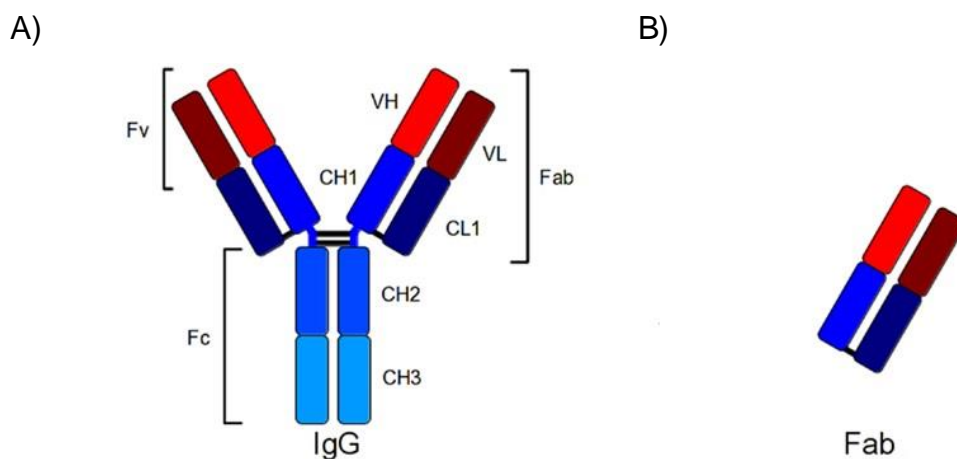


Figura 6: Estrutura convencional de anticorpo IgG (A) e do fragmento de reconhecimento do antígeno (Fab) em separado (B). Em vermelho: fração variável pesada (VH) e leve (VL). Em azul: fração constante pesada e leve. Bastões em preto representam pontes dissulfeto (Frenzel *et al.*, 2013).

As sequências mais importantes para a determinação da especificidade do anticorpo com relação ao reconhecimento do antígeno são as sequências determinadoras de complementariedade (CDRs, do inglês *complementarity determining regions*). Elas

correspondem às regiões da cadeia polipeptídica que geralmente fazem contato direto com o epítopo e formam alças expostas na extremidade da fração variável do anticorpo (Figura 7). As frações variáveis das cadeias leve e pesada apresentam 3 CDRs cada uma, numeradas CDR1, CDR2 e CDR3. A CDR3 é a que apresenta maior variabilidade dentre diferentes IgGs, sendo a responsável pela maior parte dos contatos com o antígeno (Paul, 2013).

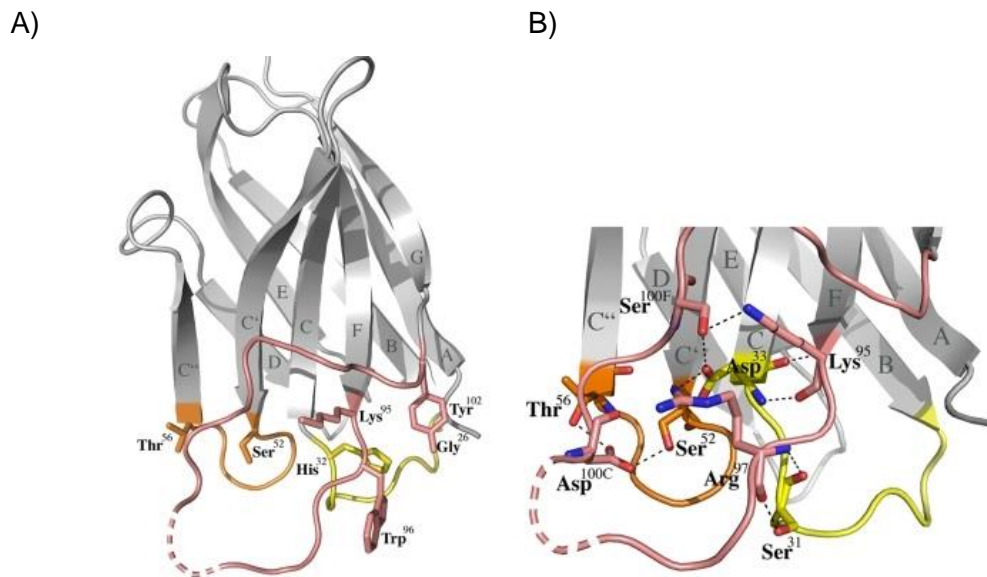


Figura 7: A) Representação da estrutura tridimensional da fração variável de um anticorpo IgG de lhama que reconhece o antígeno gp120 e suas CDRs 1, 2 e 3 (em amarelo, laranja e salmão respectivamente). B) Aproximação da região dos CDRs. As cadeias laterais dos resíduos em destaque são importantes para a interação intramolecular do anticorpo, estabilizando a sua estrutura (Hinz *et al.*, 2010).

Para a produção de anticorpos para diagnóstico e tratamento, deve-se levar em conta o grau de especificidade do anticorpo desejado. Anticorpos policlonais, que se ligam a diferentes epítomos de um mesmo antígeno, são utilizados, por exemplo, para manter uma proteção passiva. A produção de anticorpos policlonais é feita através da inoculação do antígeno alvo em um animal (e.g. rato, coelho), o que induz a produção de anticorpos para esse antígeno pelos linfócitos-B. Os anticorpos são, então, purificados a partir do soro coletado do animal (Lipman *et al.*, 2005).

Anticorpos monoclonais, que visam um epítopo específico, também podem ser manipulados e produzidos em larga escala, geralmente em células de mamífero, bactérias ou levedura. A vantagem do uso desse tipo de anticorpo está na alta especificidade, tornando-o uma ferramenta útil em tratamentos que visam um alvo determinado, como um receptor ou um vírus. Um anticorpo contra um receptor específico de células cancerosas,

por exemplo, pode recrutar células de resposta imunológica do organismo para degradá-las (Lipman *et al.*, 2005).

A estrutura convencional de IgGs exige um alto controle de expressão e enovelamento da proteína, o que é de difícil reprodução *in vitro*. Essa limitação, aliada ao avanço de técnicas de manipulação genética, observando a ocorrência na natureza de diferentes tipos de anticorpos com estruturas mais simples, como de camelídeos (Welosowski *et al.*, 2009), levou ao desenvolvimento de fragmentos de anticorpos, que podem ser produzidos mais facilmente e com maior aproveitamento, mas ainda mantendo a funcionalidade desejada. Os fragmentos de anticorpos mais utilizados em diagnóstico são os Fab (Figura 6-B) e fragmentos de anticorpos de fração variável de cadeia única (scFv, do inglês *single chain variable fragment*). Por serem menores que o IgG convencional, o processo de dobramento da proteína requer menos controle, tornando-os bons candidatos para expressão em procariotos (Frenzel *et al.*, 2013).

1.5. ESTRUTURA E PROPRIEDADES DOS AMINOÁCIDOS

Para a realização de análises estruturais de interação proteína-proteína, como entre um anticorpo e o seu antígeno, é necessário ter um conhecimento sobre as características de cada aminoácido, uma vez que são interações entre eles que irão determinar a afinidade de uma interação proteína-proteína, bem como a estrutura terciária de cada proteína.

A estrutura básica das proteínas compreende a cadeia principal e as cadeias laterais, sendo a primeira formada pelos carbonos- α de cada aminoácido e as ligações peptídicas entre eles e a segunda. As cadeias laterais de cada aminoácido projetam-se a partir da cadeia principal da proteína, influenciando no seu dobramento e em interações intra e intermoleculares (Nelson & Cox, 2011). O carbono central da estrutura básica do aminoácido é denominado carbono quiral (com exceção de glicina), ou carbono- α e está ligado ao grupo amino e ao grupo carboxila (cujos átomos N, C e O são assim denominados na nomenclatura estabelecida) (Figura 8-A). Além do carbono central, os átomos que formam a cadeia lateral do aminoácido, quando repetidos, também recebem um sufixo representativo de sua posição, como exemplificado na figura 8-B.

A ligação peptídica consiste-se em uma ligação covalente entre o grupo carboxila e o grupo amino de dois aminoácidos. Com essa reação, o grupo carboxila perde uma molécula de hidrogênio e uma de oxigênio, enquanto o grupo amino libera uma molécula de hidrogênio. Ocorre, então, a formação de uma molécula de água e da ligação

covalente entre o nitrogênio de um aminoácido e o carbono do grupamento carboxila de outro (Figura 8-C). Tal reação requer consumo de energia, fornecida em sistemas vivos na forma de ATP (Nelson & Cox, 2011).

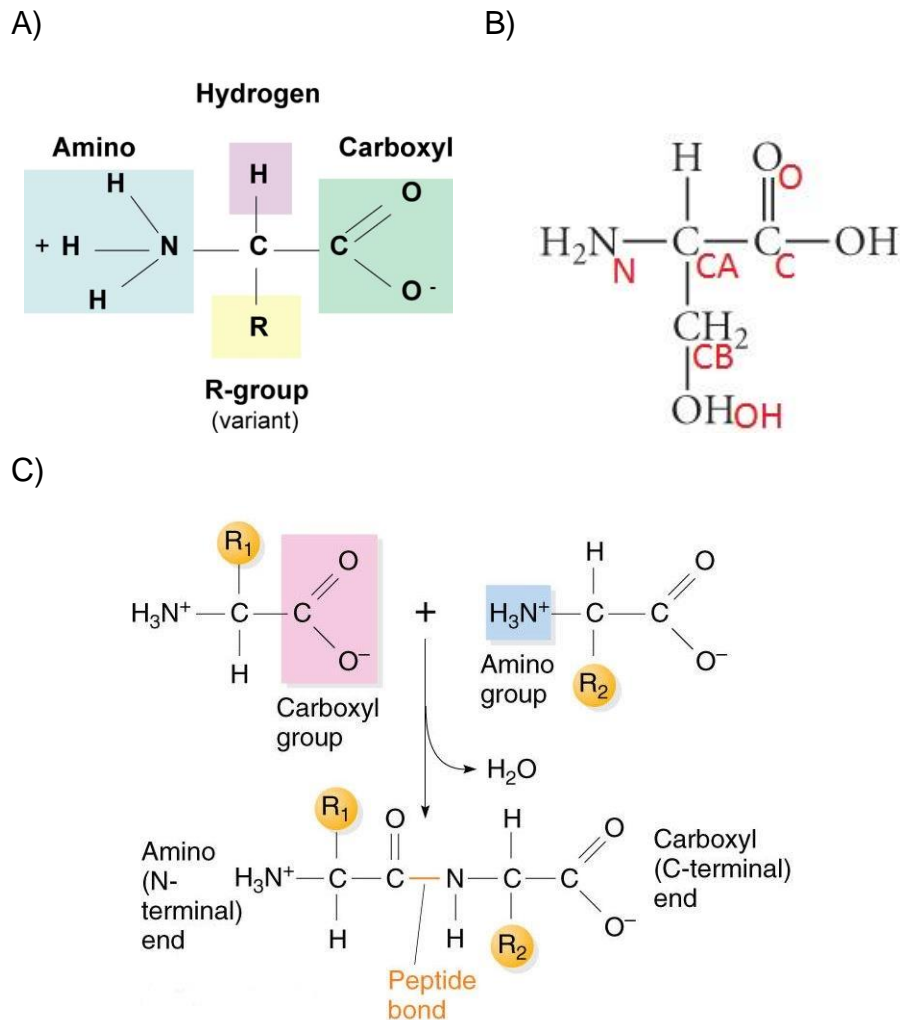


Figura 8: A) Representação da estrutura geral de um aminoácido, sendo um carbono ligado aos grupos amino e carboxila (que formam as ligações peptídicas) e um radical variável. B) Representação da estrutura de uma serina. Em vermelho: nomenclatura utilizada para cada átomo da serina. C) Representação da formação de uma ligação peptídica. O grupo carboxila de um aminoácido reage com o grupo amino de outro aminoácido, liberando uma molécula de água e a formação da ligação peptídica (Russell *et al.*, 2010).

De forma geral, as cadeias laterais dos aminoácidos podem ser classificadas em hidrofóbicas e hidrofílicas, sendo estas polares ou carregadas (positivamente ou negativamente), tais características conferindo propriedades específicas de interação com outras cadeias laterais ou ligantes. Além disso, a presença de certos resíduos pode interferir na flexibilidade da cadeia polipeptídica. Enquanto a glicina, por exemplo, confere flexibilidade à cadeia e está geralmente presente em regiões do tipo alça, a prolina

confere rigidez à cadeia devido a sua cadeia lateral formar uma estrutura em anel com seu o grupo amino (Van Vranken e Weiss, 2013). A Figura 9 mostra uma forma de classificação dos aminoácidos.

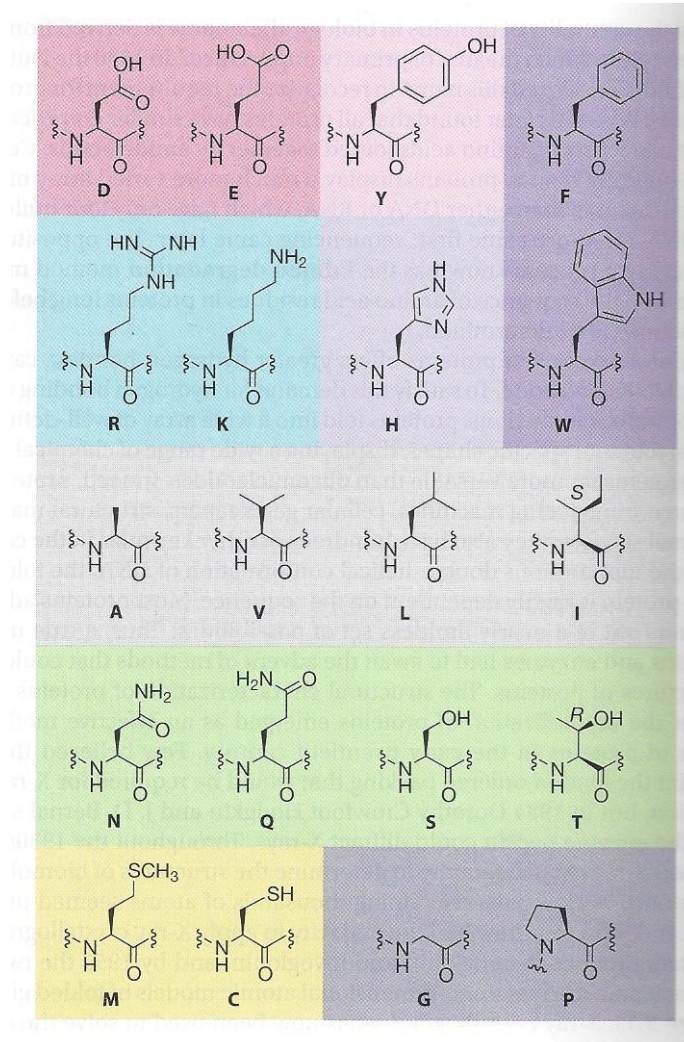


Figura 9: Representação dos aminoácidos e sua classificação segundo propriedades das cadeias laterais. Por cores, estão separados os grupos dos aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas (verde), carregadas negativamente (vermelho), carregadas positivamente (azul e H, em cinza), apolares aromáticas (roxo e Y, em rosa claro), apolares com enxofre (amarelo) e apolares alifáticas (cinza claro). G e P (cinza escuro) estão separados em um grupo que exerce maior influência na flexibilidade da cadeia principal. H e Y estão separados de seus grupos por também apresentarem características de outros grupos (H também possui cadeia lateral aromática, enquanto Y também pode agir como um doador de prótons) (retirado de Van Vranken e Weiss, 2013).

As cadeias laterais de cada aminoácido, para formar interações com cadeias laterais de outros aminoácidos (dentro da mesma proteína ou com uma proteína diferente) devem romper as interações com as moléculas de água adjacentes (dessolvatação). Aminoácidos polares interagem mais fortemente com as moléculas de água do solvente,

formando ligações de hidrogênio. Logo, para a formação de uma ligação com outra cadeia lateral polar, o custo energético de dessolvatação exigido é maior do que, por exemplo, na interação entre dois aminoácidos hidrofóbicos. Dessa maneira, interações entre aminoácidos hidrofóbicos ocorrem mais frequentemente do que entre aminoácidos polares em regiões não expostas da proteína, sendo importantes para o seu enovelamento (Van Vranken e Weiss, 2013). Outra característica importante para diferenciar aminoácidos que pode influenciar na interação proteína-proteína é o tamanho de sua cadeia lateral. Em uma interação proteína-proteína, um resíduo com uma cadeia lateral longa, como a arginina, pode alcançar a cadeia principal ou lateral de um resíduo que esteja mais distante e formar uma interação polar entre os dois resíduos. Em contrapartida, resíduos de cadeia lateral curta podem dar espaço para que um resíduo do parceiro de interação se aproxime da molécula, sendo que a substituição de um desses resíduos por um que contenha uma cadeia lateral longa pode impedir a aproximação do parceiro de interação.

1.6. ANÁLISE ESTRUTURAL COMO FERRAMENTA PARA OTIMIZAÇÃO DE ANTICORPOS

Estruturas de proteínas determinadas através de cristalografia de raios X compreendem a maioria das estruturas disponíveis em bancos de dados *online* atualmente e consistem-se em ferramentas importantes para diversas análises. A análise estrutural *in silico* de proteínas é bastante útil como estudo inicial buscando otimizar interações proteína-proteína ou proteína-ligante, como por exemplo a afinidade de um anticorpo pelo antígeno. Diversas plataformas e programas de otimização da estrutura de proteínas estão disponíveis para uso e oferecem ferramentas capazes de simular, *in silico*, a reconstrução de proteínas por meio de variações na cadeia principal e mutações na sequência de aminoácidos (Pantazes *et al*, 2014). Através dessas simulações a nível molecular, testes *in silico* servem como uma forma de triagem, ou um passo inicial de estudos que seriam muito dispendiosos caso testassem todas as possibilidades (e.g. interação de uma enzima com diversos ligantes) *in vitro*.

Para otimizar a afinidade de anticorpos com o antígeno, métodos *in silico* permitem modelar o sítio de interação com o antígeno e testar os modelos criados por meio de simulações das interações (*docking*) e cálculo da variação da energia livre de interação. É possível ainda realizar aproximações com relação à orientação relativa das frações variáveis das cadeias leve e pesada (Kuroda *et al.*, 2012).

Como exemplo de análises estruturais aplicadas à otimização da interação antígeno-anticorpo, Kiyoshi e colaboradores (Kiyoshi *et al.*, 2014) construíram uma biblioteca virtual de mutações na região CDR do anticorpo 11K2, utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias. Para cada mutação (19 para cada aminoácido) um modelo molecular foi gerado e a interação com o antígeno foi otimizada por métodos de dinâmica molecular. As forças de interação Van der Waals e eletrostáticas de cada interação foram comparadas para a triagem dos anticorpos mutantes com maior afinidade pelo antígeno. Tal triagem permitiu a seleção de anticorpos otimizados *in silico* para a realização de ensaios de interação *in vitro*.

Em outro trabalho (Diskin *et al.*, 2011), foi verificado por meio de análise estrutural que um anticorpo anti-gp120 de HIV-1 teria sua área de interação com o antígeno aumentada com a substituição de uma fenilalanina na região CDR-2 por um triptofano, aumentando a força de interação hidrofóbica com a superfície interna de gp120. Ensaios *in vitro* de interação por ressonância plasmônica e de neutralização de vírus HIV-1 confirmaram o aumento da afinidade do anticorpo com o antígeno e de seu potencial neutralizador.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar análises estruturais *in silico* como estudo inicial para proposta de modelos de interação anticorpo-antígeno-anticorpo para a captura e reconhecimento do antígeno p24 de HIV-1

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aprender os fundamentos e a utilização de ferramentas computacionais necessárias para análise estrutural de proteínas
- Analisar a região de interação do antígeno p24 com anticorpos anti-p24 de estrutura conhecida
- Analisar a variabilidade da composição de aminoácidos de cada epítipo em subtipos de HIV-1 presentes no Brasil e mapear estas variações na região de interface antígeno-anticorpo

3. METODOLOGIA

3.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E LEVANTAMENTO DE ESTRUTURAS CONHECIDAS DE ANTICORPOS ANTI-P24

Para a análise comparativa entre diferentes anticorpos anti-p24, foi feita busca das estruturas disponíveis no banco de dados de estrutura de proteínas Protein Data Bank (Berman *et al*, 2000) e de publicações que incluam a resolução de uma estrutura tridimensional de um anticorpo anti-p24 de HIV-1.

Para a captura e reconhecimento do antígeno em um teste de imunodiagnóstico, são necessários anticorpos que se liguem a domínios diferentes do antígeno (C-terminal ou N-terminal). Portanto, o levantamento englobou anticorpos conhecidos para o reconhecimento de ambos os domínios.

Para a visualização dessas estruturas, tanto individualmente quanto em complexo com o antígeno/epítipo, foram utilizados softwares de visualização da estrutura tridimensional de proteínas *PyMOL* (Schrödinger LCC) e *Coot* (Lohkamp *et al.*, 2005).

Foi feito um levantamento de dados referente às regiões de interação com o antígeno de cada anticorpo (cadeias leve e pesada), à sequência de seu respectivo epítipo em p24 e os resultados descritos pelos autores, dos artigos referência de cada estrutura, com relação à especificidade/afinidade da ligação.

3.2. ANÁLISE DAS INTERFACES DE INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO

As interações dos diferentes anticorpos com o seu respectivo epítipo no antígeno p24 foram analisadas e comparadas com relação ao número e tipos de interações entre os pares de resíduos. Para essa análise, foram utilizados a plataforma *PDBe PISA* (Krissinel e Henrick, 2007) disponibilizada pelo Instituto Europeu de Bioinformática (*EBI*) e o software *LigPlot+* (Laskowski & Swindells, 2011).

O *PDBe PISA* permite calcular dados referentes às propriedades químicas e estruturais de interações proteína-proteína. A partir de um arquivo de coordenadas atômicas, a plataforma fornece informações sobre o número de resíduos que participam da interação em cada uma das moléculas e, especificamente, os que formam ligações de hidrogênio e pontes salinas. São também calculados os valores de ΔG (kcal/mol) e a área da superfície molecular (Å^2) envolvida na interação, tanto para cada resíduo como para a interface total de interação entre as duas moléculas. O valor de ΔG é calculado como a

diferença entre a energia de solvatação das estruturas e dos resíduos isolados com a energia de solvatação na formação do complexo. O cálculo é cada feito sem levar em conta a formação de ligações de hidrogênio e pontes salinas na interface de interação, o que limita o uso da comparação do ΔG como análise da interface de interação. Desse modo, ΔG negativos indicam apenas que a formação de interações hidrofóbicas e de Van der Waals em uma interface são favoráveis energeticamente.

O programa *LigPlot+* também realiza uma análise da região de interação entre duas moléculas e constrói uma representação bidimensional dos pares de interação envolvidos na formação de um complexo proteína-proteína ou proteína-ligante, distinguindo distância entre os resíduos e o tipo de interação, entre ligações de hidrogênio ou interação hidrofóbica. Dessa maneira, foi possível identificar os resíduos envolvidos em interações hidrofóbicas com a formação do complexo, que também contribuem de maneira importante para a estabilidade da interface entre antígeno e anticorpo.

Com a comparação dos dados obtidos através dos dois programas, foi possível determinar os pares de interação envolvidos na formação dos complexos e os valores de ΔG e área da interface de interação para cada par, assim como para a interface total. Com a mensuração da energia envolvida nas interações proteína-proteína, torna-se possível comparar diferentes complexos antígeno-anticorpo e a análise do efeito causado por mutações pontuais na região de interface desses complexos.

3.3. ENSAIOS DE *DOCKING* MOLECULAR

Os ensaios de *docking* (ou ancoragem molecular) entre os fragmentos de anticorpo e os seus respectivos antígenos foram feitos utilizando a ferramenta disponível online *Rosetta Docking* (Lyskov & Gray, 2008).

O *Rosetta Docking* utiliza um algoritmo que faz uma busca local testando diferentes conformações de interação entre duas proteínas a partir de uma dada posição inicial. O algoritmo gera 1000 simulações independentes e aleatórias a partir de modificações nas posições das duas proteínas, passando por duas fases de análise de possibilidades, uma de baixa e uma de alta resolução.

Na fase de baixa resolução, são testadas diferentes posições e orientações da cadeia de cada proteína como corpo rígido, sendo as cadeias laterais representadas por pseudoátomos. Após a fase de baixa resolução, na chamada fase de alta resolução, são testados diferentes rotâmeros das cadeias laterais. Em cada fase, o programa calcula um *score* de energia total do complexo gerado no *docking*, sendo que complexos com maior

score são mais energeticamente favoráveis. Na fase de baixa resolução, esse score é maior em posições de corpo rígido que incluem uma maior superfície de contato, evitando sobreposição das proteínas, e leva em conta a probabilidade de ocorrência dos pares de interação. Na fase de alta resolução, o score de energia é calculado com base em interações de Van der Waals, formação de ligações de hidrogênio que sejam dependentes da orientação dos resíduos envolvidos, custo de dessolvatação e probabilidade de ocorrência de rotâmeros. Além do score de energia, também é calculado o deslocamento que cada átomo sofreu após o *docking* com relação à sua posição inicial (determinada pelas coordenadas tridimensionais do arquivo de coordenadas atômicas do modelo inicial). Um valor de RMSD (do inglês, *root-mean-square deviation*) também é calculado, representando a média desses deslocamentos em todo o complexo (Lyskov & Gray, 2008).

Como resultado, o programa fornece arquivos de coordenadas das 10 estruturas que apresentaram menor produto *score* x RMSD (quanto menor a energia total do complexo e a perturbação com relação à estrutural original, mais adequada a estrutura resultante como um modelo de *docking*) (Figura 10). No presente trabalho, para cada ensaio de *docking* utilizando o Rosetta Docking, foi selecionado apenas a estrutura de menor produto *score* x RMSD para as análises subsequentes.

Interface score I_{sc} / RMSD and Top-10 " I_{sc} score models"

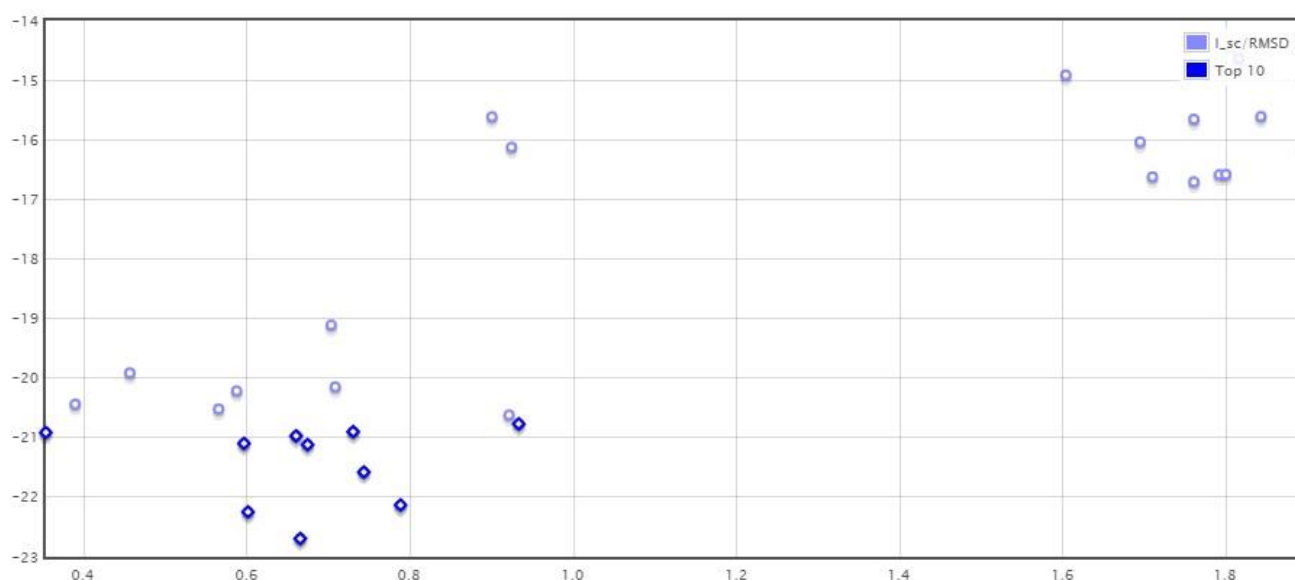


Figura 10: Gráfico disponibilizado pelo programa *RosettaDocking* com os modelos obtidos após o *docking* (eixo X: RMSD, eixo Y: *score* de energia). Os modelos com menor produto *score* x RMSD formam um aglomerado no gráfico, sendo que estão destacados em azul escuro os 10 modelos com menor produto *score* x RMSD.

No presente trabalho, os ensaios de *docking* foram utilizados para testar diferentes modificações na sequência de aminoácidos dos fragmentos de anticorpos e no antígeno (ver item 3.4 da metodologia) e suas possíveis influências na interação do complexo. Entretanto, antes dessas análises, foi necessário validar a metodologia utilizada, por meio de ensaios controle positivos e negativos.

Como controle positivo, foi realizado *docking* molecular utilizando os arquivos de coordenadas atômicas dos complexos antígeno-anticorpo sem nenhuma modificação em sua sequência de aminoácidos. Após o *docking*, verificou-se se as características da interface de interação (obtidas através do *PDBe PISA* e *LigPlot+*) permaneceram as mesmas do que antes do *docking*. Tal teste permitiu verificar se o método utilizado pelas plataformas de *docking* poderia por si só alterar significativamente a interface de interação das moléculas e a formação dos pares de interação entre resíduos.

Como controle negativo, foram introduzidas substituições pontuais de aminoácidos nas sequências do antígeno p24 ou do anticorpo, visando a quebra de ligações de hidrogênio e pontes salinas presentes na estrutura original. Para cada estrutura, foram escolhidos pares de interação críticos, como as ligações de hidrogênio envolvendo uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos, para a introdução de uma mutação pontual através do software *Coot*.

Quando disponíveis, dados obtidos em experimentos *in vitro*, descritos nos mesmos estudos de obtenção das estruturas de cada complexo, também foram levados em conta para a realização dos ensaios de *docking* controle.

3.4. ANÁLISE E MAPEAMENTO DA VARIABILIDADE DE EPÍTOPOS NA INTERFACE DE INTERAÇÃO

Para garantir a abrangência da ligação do anticorpo com o antígeno, o epítipo reconhecido deve estar conservado entre os genomas de diversos subtipos de HIV-1.

Utilizando bancos de dados de sequências genéticas *Los Alamos HIV Database* (Foley *et al.* 2013), os epítipos de p24 reconhecidos por cada anticorpo foram analisados com relação à variabilidade de sua sequência entre subtipos de HIV-1 presentes no Brasil. Serão considerados os subtipos: B, BC, BF, BF1, F1, C, D, U, O2-AG e O para o mapeamento, sendo que os subtipos B, BC, BF1, F1 e C são prevalentes em 98% dos isolados virais no Brasil até 2015. Os demais subtipos, apesar de ocorrência rara, também já foram identificados em indivíduos infectados no Brasil (Foley *et al.* 2015).

Os aminoácidos, contidos nos epítipos, que apresentaram substituição entre os

subtipos de HIV-1 foram mapeados na região de interação utilizando o programa de visualização de estruturas *Coot* e avaliados conforme sua participação na interface de interação, com base nas análises feitas com o *PDBe PISA* e o *LigPlot+*. Para cada complexo antígeno-anticorpo, foram escolhidos para análise pares de resíduos envolvidos em ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas entre as duas moléculas e ainda que incluem um resíduo do antígeno p24 que sofre uma variação significativa entre diferentes subtipos de HIV-1.

Após a realização dos ensaios controle, foram escolhidas variações de resíduos do antígeno p24 consideradas “críticas” para a interação entre o anticorpo e o antígeno para serem testadas em novos ensaios de ancoragem molecular. Os tais resíduos críticos foram escolhidos com base no grau de sua variação (se eles são substituídos por outro resíduo de características diferentes em outros subtipos de HIV-1) e na presença dos mesmos em regiões de interação direta com o anticorpo.

Para cada complexo antígeno-anticorpo, as variações de aminoácidos do antígeno avaliadas como sendo críticas para o seu par de interação foram aplicadas na estrutura do complexo através do *Coot*. Utilizando as plataformas *Rosetta Docking* e *HADDOCK 2.2.*, foi feito um *docking* com a estrutura mutada, e a interface de interação resultante foi analisada com o *PDBe Pisa* e *LigPlot+*.

4. RESULTADOS

4.1. LEVANTAMENTO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS CONHECIDAS DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS ANTI-P24

A partir de buscas no banco de dados Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), foram selecionados os anticorpos Fab13B5 (Monaco-Malbet *et al.* 2000; código PDB: 1E6J) e Fab10AF9 (Gu *et al.*, 2013; código PDB: 3VRL), que se ligam à região C-terminal do antígeno p24, e os anticorpos FabCB41 (Keitel *et al.*, 1997; código PDB: 1CFN) e Fab25.3 (Momany *et al.*, 1996; código PDB: 1AFV), que se ligam à região N-terminal, para realização das análises estruturais.

Abaixo, está representada a sequência de aminoácidos do antígeno p24 (Foley *et al.*, 2013) e os respectivos epítomos de cada um desses anticorpos (Figura 11).

PIVQNIQQQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSE GATPQDLNTML NTVG
 GHQAAMQMLKETI NEEAAEWDRVHP VHAGPIAPGQMREPR RGSDIAGTTSTLQE QIGWM
 TNNPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSIL DIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQE
VKNWMTETLLVQANANPDCKTILK ALGPAATLEEMMTA CQGVGGPGHKARVL

Figura 11: Sequência do antígeno p24. No domínio C-terminal (em vermelho) está sublinhada a região de interação com o Fab10AF9 e destacado em amarelo o epítopo reconhecido pelo Fab13B5 (ambos se sobrepõem nos aminoácidos 'ALGP'). No domínio N-terminal (em azul), está destacado em amarelo o epítopo reconhecido pelo FabCB41 e sublinhado o epítopo descontínuo reconhecido por Fab25.3.

4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS REGIÕES DE INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO

A seguir, serão descritos os resultados das análises estruturais para cada complexo antígeno-anticorpo. Primeiramente, serão descritos os resultados dos complexos envolvendo os anticorpos que se ligam à região C-terminal do antígeno p24, Fab13B5 e Fab10AF9, seguidos dos anticorpos que se ligam à região N-terminal, Fab25.3 e FabCB41, nesta ordem.

Todas as estruturas foram resolvidas pelo método de cristalografia, e para cada estudo foram feitas análises estruturais com diferentes objetivos. Algumas dessas análises serão descritas a seguir e servirão como dados para dar suporte às análises feitas no presente trabalho. Todos os anticorpos que fazem parte dos complexos das

estruturas utilizadas são do tipo Fab, ou seja, apresentam apenas a porção Fab (variável), responsável pela ligação ao anticorpo.

4.2.1. Análise – Fab13b5-p24

4.2.1.1. Fab13B5-p24 – Análise preliminar da estrutura

Monaco-Malbet e colaboradores (Monaco-Malbet *et al.*, 2000) obtiveram modelos estruturais do fragmento de anticorpo Fab13B5 sozinho e em complexo com o antígeno p24. Os modelos do Fab13B5 (PDB: 1E6O, de resolução 1.8 Å) e do complexo Fab13B5-p24 (PDB:1E6J, de resolução 3.0 Å) foram obtidos através do método de substituição molecular, em que estruturas conhecidas de proteínas homólogas são utilizadas como referência para a resolução dos dados de difração do cristal. A estrutura do complexo foi sobreposta à estrutura previamente descrita da região C-terminal de p24 (PDB: 1AM3, de resolução 1.7 Å) e do Fab13B5 sozinho (PDB: 1E6O, de resolução 1.8 Å) para mapeamento das mudanças conformacionais ocorridas com a formação do complexo. A resolução obtida para a estrutura do complexo (3 Å) foi menor do que a do anticorpo e do antígeno sozinhos. Como todas as análises no presente trabalho foram feitas utilizando a estrutura do complexo de baixa resolução, tal fato deve ser levado em conta para a discussão e conclusões.

A região de interação do antígeno p24 com o Fab13B5 consiste-se no epítipo contínuo 'ALGPAAT(L)EE(MM)TA' (resíduos 204 a 217 do antígeno p24), sendo que os resíduos entre parênteses não estão envolvidos em interações diretas com resíduos do Fab. Apenas quatro CDRs do anticorpo Fab interagem com o antígeno, sendo três delas da cadeia pesada. A predominância da cadeia pesada na interação com o antígeno é comum, porém é extremo no caso do Fab13B5, uma vez que as CDR-L1 e CDR-L2 não apresentam nenhuma interação com p24. Enquanto a cadeia leve forma apenas uma ligação de hidrogênio com o antígeno e possui uma área de interface de interação próxima a 146 Å², a cadeia pesada forma sete pares diferentes com o antígeno por meio de ligações de hidrogênio e apresenta uma área total de interação de cerca de 515 Å².

De acordo com as análises de sobreposição de estruturas, a região compreendida entre os resíduos da cadeia pesada H99 e H108 (CDR-H3) é a que sofreu maior mudança conformacional após a interação com o antígeno. Tal mudança resultou no deslocamento do resíduo E213 do antígeno para a região entre as CDR-H1 e CDR-H3. Tal resíduo forma uma ligação de hidrogênio com Y105, de distância 2.79 Å, e três ligações de hidrogênio

com T33 da cadeia pesada do Fab (Figura 12). Já com relação ao antígeno, o resíduo P207 foi o que sofreu maior deslocamento com a interação, mais especificamente o oxigênio do seu grupo carboxila, que aponta em direções diferentes em cada uma das estruturas e se deslocou 4 Å (Figura 13).

Por meio da determinação da estrutura de Fab13B5 mutado (A208G), ligado ao p24, Monaco-Malbet e colaboradores compararam as estruturas a fim de verificar diferenças na interação. Os autores escolheram testar esta substituição especificamente, pois ela ocorre comumente entre diversos subtipos de HIV (Tabela 1). De acordo com os autores, em resultados não publicados, não foi notada nenhuma perturbação na interface de interação, com exceção da remoção do grupo metil, porém houve uma sutil perda de afinidade do complexo (a metodologia utilizada para aferir a perda de afinidade do complexo não foi descrita).

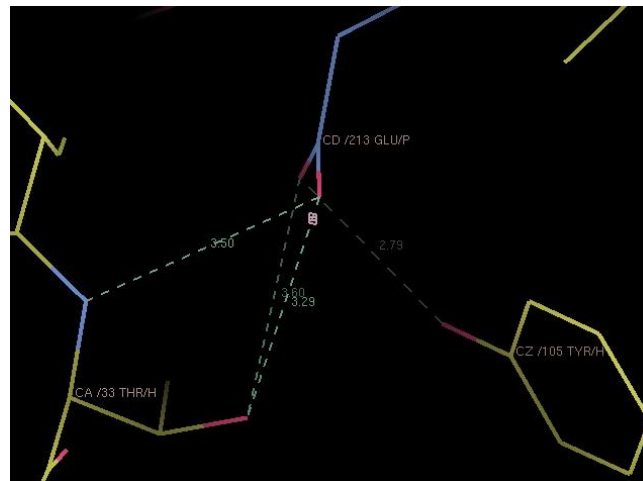


Figura 12: Representação tridimensional da interação de E213, resíduo do antígeno p24 (azul), com Y105 (ligação de hidrogênio com distância de 2.79 Å) e com T33 (três ligações de hidrogênio), ambos da cadeia pesada (amarelo).

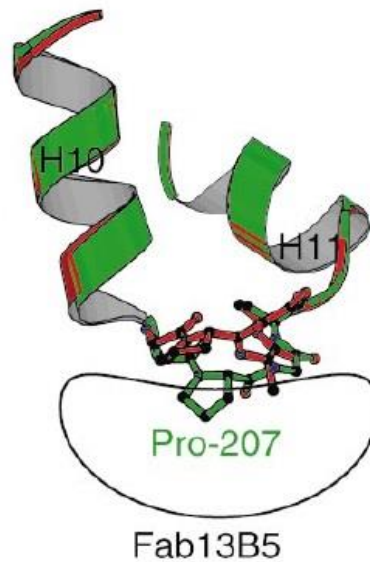


Figura 13: Representação do deslocamento do resíduo P207, encontrado na alça entre as hélices H10 e H11 no antígeno p24, com a interação com Fab13B5 (vermelho: sem interação; verde: após a formação da interação) (retirado de Monaco-Malbet *et al.* 2000).

4.2.1.2. Fab13B5-p24 – Identificação dos pares de interação e análise da variabilidade do epítipo

Abaixo, está representada a sequência do epítipo de p24 reconhecido pelo Fab13B5 (Tabela 1). Os resíduos que formam pares de interação com o antígeno, assim como os resíduos do antígeno que sofrem variação entre diferentes subtipos de HIV, estão em destaque. Os pares de interação formados na interface do complexo Fab-p24 foram identificados através das análises feitas com os programas *PDBePISA* e *LigPlot+*. O resíduo P207 do antígeno p24 foi identificado como sendo importante para a interação entre antígeno e anticorpo, uma vez que, além de participar de interações hidrofóbicas e de Van der Waals com o anticorpo, ele sofre significativa mudança conformacional com a formação da interação. O resíduo P207 de p24, ainda, sofre variação em 3 subtipos diferentes de HIV-1, sendo substituído por 3 aminoácidos diferentes, como pode ser observado na tabela 1.

Resíduos do anticorpo que interagem:	Resíduos do epítipo (p24):	Variação de resíduos do epítipo dentre subtipos de HIV-1:
T92-L (N)	A204 (O)	G (F1)
W80-L, W90-L, N91-L, F94-L,	A204	
Y50-H (OH)	L205 (O)	
Y50-H, Y105-H, F94-L	L205	
Y50-H	G206	
Y50-H, N59-H	P207	S (F1), Q (C), T (U)
Y50-H (OH), N52-H (ND2)	A208 (N, O)	G (BC, BF, BF1, F1, C, U, O2-AG, O), Q (D)
Resíduos do anticorpo que interagem:	Resíduos do epítipo (p24):	Variação de resíduos do epítipo dentre subtipos de HIV-1:
N52-H, T50-H, Y105-H	A208	
Y33-H, Y50-H, N52-H, Y57-H, Y105-H	A209	
S31-H (O)	T210 (OG1)	S (BC, BF1, C)
S31-H, T33-H, N52-H	T210	
	L211	I (BC)
S31-H	E212	
T33-H (OG1, N), Y105-H (OH)	E213 (OE1, OE2, OE2)	
S31-H, Y32-H, T33-H, V101-H, Y105-H	E213	
V101-H	T216	
V101-H	A217	

Tabela 1: Nas duas primeiras colunas: relação dos resíduos do anticorpo que interagem com os resíduos do epítipo de p24, por meio de ligações de hidrogênio (fundo azul) e interação hidrofóbica (fundo amarelo). Os átomos que participam das ligações de hidrogênio estão indicados entre parênteses. Os resíduos indicados por “-H” pertencem à cadeia pesada do anticorpo, enquanto os resíduos identificados por “-L” pertencem à cadeia leve. Na terceira coluna estão listadas as variações de aminoácidos para cada resíduo do epítipo, dentro de diferentes subtipos de HIV-1 (listados para cada variação entre parênteses). Substituições que modificam as propriedades de carga do mesmo estão destacadas em vermelho.

Em todos os casos, a prolina (P), um aminoácido apolar e que confere rigidez à cadeia polipeptídica, é substituída por um aminoácido polar não carregado, sendo que a

glutamina (Q) possui uma cadeia lateral maior que serina (S) e treonina (T). Dessa forma, é possível que as variações encontradas no resíduo P207 do antígeno p24 possam interferir na interação com o Fab13B5.

Outra variação importante encontrada no antígeno está no resíduo A208, substituído por glicina (G) na maioria dos subtipos de HIV-1 analisados na comparação, inclusive os subtipos prevalentes no Brasil BC, BF, BF1, F1 e C. Como já citado, essa substituição foi testada por Monaco-Malbet e colaboradores e resultou em uma sutil perda de afinidade com o antígeno.

4.2.1.3. Fab13B5-p24 – Ensaio de *docking* controles

Inicialmente realizamos o que chamamos de ensaios de *docking* molecular controles, de forma a garantir a validade das ferramentas computacionais utilizadas para as análises da interação anticorpo-antígeno e eventuais efeitos de mutações de resíduos que participam da interação. Como controle positivo, as estruturas de cada complexo foram submetidas ao mesmo protocolo de *docking* sem nenhuma modificação em suas sequências ou coordenadas. O objetivo foi verificar a reprodução, após o *docking*, das mesmas características e pares de resíduos que participam da interação. Dessa forma, variações na superfície de interação resultantes do próprio procedimento de *docking* poderiam ser avaliadas.

Para o controle negativo, foram feitas mutações pontuais na sequência do anticorpo Fab13B5, visando a perda de interações entre o Fab e o p24. Foram mutados resíduos que interagem com vários resíduos do parceiro de interação e formam ligações por meio de sua cadeia lateral, tendo sido escolhidos os resíduos Y50 e N52 da cadeia pesada do Fab para a substituição por alanina (A), visando a perda das interações de hidrogênio feitas por eles.

Foi feito, ainda, um controle baseado em dados experimentais, reproduzindo a mesma mutação realizada por Monaco-Malbet e colaboradores, para analisar e comparar o resultado com o que foi descrito pelos autores. Foi feita a substituição do resíduo A208 por glicina, discutida acima como ocorrente em diversos subtipos de HIV, porém verificada como tendo pouca interferência na interação com Fab13B5-p24.

O controle positivo manteve os mesmos pares de interação por ligações de hidrogênio observados no complexo original (código PDB: 1E6J). Entretanto, analisando a tabela 2, é possível notar que houve diferenças no número de interações hidrofóbicas e no ΔG da interface do antígeno com a cadeia pesada do Fab. Tais diferenças indicam

alterações causadas pelo protocolo de *docking*.

No controle negativo com as mutações Y50A e N52A, diminuiu-se, como esperado, o número total de ligações de hidrogênio feitas entre a cadeia pesada e o antígeno p24. A perda das interações originalmente feitas por Y50-H e N52-H com p24 levou à diminuição da área total da interface de interação e aumento do ΔG , tanto na interface de interação com a cadeia pesada quanto com a cadeia leve do Fab. No controle realizado com mutação A208G no epítipo, feita no mesmo estudo de obtenção da estrutura do complexo, todos os pares que formam ligações de hidrogênio foram mantidos, no entanto uma ligação do par E213 do antígeno e T33 do anticorpo não ocorreu após o *docking*. Houve diminuição na área total da interface de interação (menor do que a observada no controle negativo), porém o novo resíduo G208 manteve as duas ligações de hidrogênio que a alanina da sequência original faz com N52 e Y50, o que é compreensível uma vez que elas envolvem os átomos N e O da cadeia principal do resíduo do epítipo.

	Área da interface de interação (\AA^2)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura original	H: 515.2, L: 146.5	H: -6.4, L: -3	H: 8, L: 1	H: 23, L: 5
Controle positivo	H: 517.2, L: 149.4	H: -5.7, L: -3	H: 8, L: 1	H: 20, L: 5
Controle experimental – A208G	H: 472.9, L: 119.2	H: -5.7, L: -2.4	H: 7, L: 1	H: 15, L: 2
Controle negativo – Y50A, N52A	H: 446.7, L: 123.4	H: -5.6, L: -2.5	H: 4, L: 1	H: 9, L: 3

Tabela 2: Valores de área da interface de interação, ΔG , número de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do Fab13B5 nos diferentes controles realizados.

4.2.1.4. Fab13B5-p24 – Ensaio de *docking* com variações no antígeno p24

Foram realizados ensaios de *docking* com as três mutações encontradas no resíduo P207 nos subtipos F1, C e U (substituição de prolina por serina, glutamina e treonina respectivamente). Como as substituições P207S e P207Q ocorrem nos subtipos F1 e C, que também incluem outra variação dentro do epítipo cada um (Tabela 1), essas outras variações também foram incluídas no ensaio de *docking*, de modo a representar epítopos provenientes destas cepas específicas de HIV-1. As variações A204G (subtipo F1) e T210S (subtipo C), entretanto, não são esperadas como tendo tanta influência na interação quanto P207Q e P207S, uma vez que as diferenças nas cadeias laterais dos

resíduos são menores. A análise das interfaces de interação está resumida na tabela abaixo:

	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura Original	H: 515.2, L: 146.5	H: -6.4, L: -3	H: 8, L: 1	H: 24, L: 4
Controle positivo:	H: 517.2, L: 149.4	H: -5.7, L: -3	H: 8, L: 1	H: 19, L: 6
Mutante p24: P207Q, T210S (C)	H: 514.2, L: 130.2	H: -5.0, L: -2.5	H: 11, L: 1	H: 22, L: 4
Mutante p24: P207S, A204G (F1)	H: 502, L: 126	H: -6, L: -2.2	H: 11, L: 1	H: 19, L: 3
Mutante p24: P207T (U)	H: 515.3, L: 143.4	H: -5.7, L: -2.7	H: 10, L: 1	H: 20, L: 5

Tabela 3: Valores de área da interface de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre diferentes variações do antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do Fab13B5. Na primeira coluna, o subtipo de HIV correspondente às substituições introduzidas é indicado entre parênteses. Os resultados obtidos para a estrutura original e para o controle positivo são repetidos para facilitar a comparação.

Nas três variações de P207 nos subtipos C, F1 e U ocorre a substituição por um resíduo polar não carregado na cadeia polipeptídica. A prolina é o único aminoácido cuja cadeia lateral está diretamente ligada ao grupo amino, formando uma estrutura em forma de anel não aromático (Figura 9). Tal característica confere maior rigidez ao resíduo e conseqüentemente à região da cadeia polipeptídica em que ele se encontra. Ainda, quando forma uma ligação peptídica com o grupo carboxila de outro resíduo, o nitrogênio da prolina não se encontra ligado a nenhum hidrogênio, limitando a capacidade de interação por ligação de hidrogênio. Dessa maneira, apesar de P207 encontrar-se próximo a resíduos do anticorpo, como Y50 e Y59 da cadeia pesada, ele não forma ligações de hidrogênio. Entretanto, com a substituição pelos resíduos Q, S e T, são formadas novas ligações de hidrogênio (Figura 14).

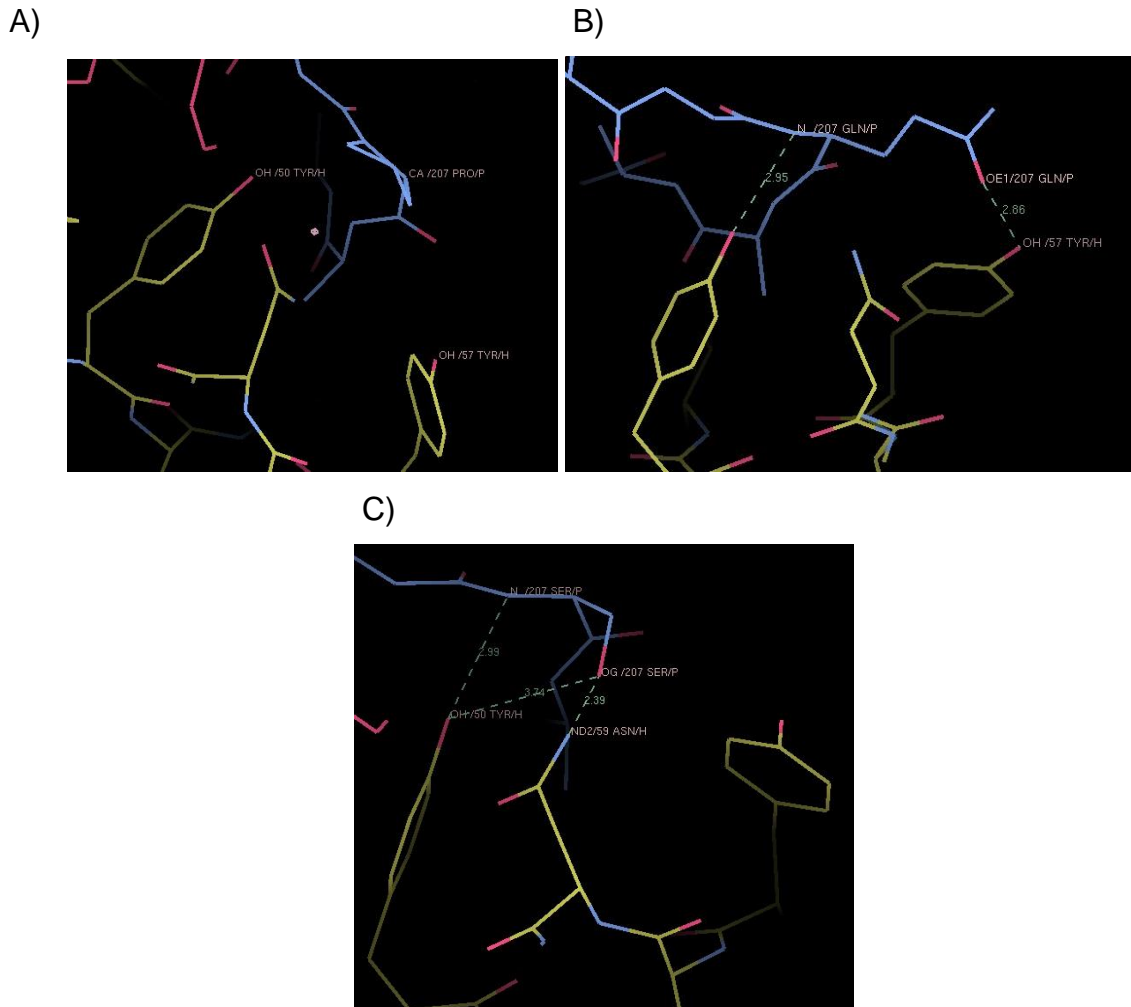


Figura 14: Representação tridimensional da região de interação ao redor do resíduo 207 do antígeno p24 (azul) e de resíduos da cadeia pesada do Fab (amarelo), sendo: A) interação entre o resíduo P207 da estrutura Fab13B5-p24 original (ausência de ligações de hidrogênio); B) substituição de P207 por glutamina e formação de ligações de hidrogênio com os resíduos Y50 e Y57 do Fab; C) substituição de P207 por serina e formação de ligações de hidrogênio com os resíduos Y50 e N59.

Apesar de haver a formação de novas ligações de hidrogênio com os epítomos representativos dos subtipos U, F1 e C, o valor de ΔG aumentou mais significativo na conformação do complexo com o antígeno de C. Com relação à área da superfície de interação, o antígeno do subtipo F1 apresentou maior diminuição quando comparado com o controle positivo a estrutura original. De maneira geral, as substituições realizadas, tanto no resíduo P207 quanto em A204 e T210, não interferiram na formação do complexo significativamente, levando a crer que ela se mantém favorável para os três subtipos

analisados. Todas as variações levaram à formação de novas ligações de hidrogênio, antes não feitas com a prolina, do antígeno da estrutura original.

4.2.2. Análise - FabA10F9-p24

4.2.2.1. FabA10F9-p24 – Análise preliminar da estrutura

O antígeno p24 é de difícil cristalização, uma vez que se consiste em dois domínios ligados entre si por um *linker* flexível. Para superar esse obstáculo, são utilizadas técnicas como a adição de mutações, como deleções ou substituição de resíduos por cisteínas, para induzir a dimerização da proteína. Gu e colaboradores (Gu *et al.*, 2013) cristalizaram o domínio C-terminal do antígeno p24 ligado ao anticorpo altamente específico FabA10F9, a fim de otimizar a estabilidade da molécula. A estrutura do complexo, que formou um dímero (Figura 15), determinada a 3.2 Å de resolução, mostrou um dímero formado por meio da interação entre as moléculas do antígeno.

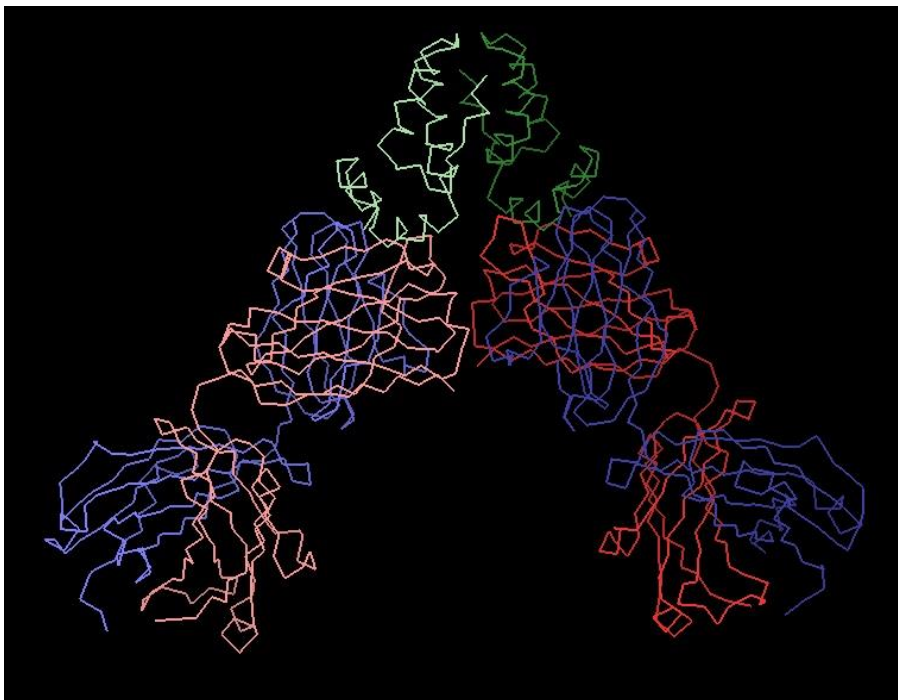


Figura 15: Representação tridimensional da estrutura de FabA10F9 em complexo com a região C-terminal de p24. Observa-se a formação de um dímero, estabilizado principalmente pela interação entre as moléculas do antígeno (verde). As cadeias pesadas do Fab estão representadas em vermelho e as cadeias leves em azul (PDB: 3VRL) (Gu *et al.*, 2013).

O FabA10F9 reconhece o epítipo contínuo 'PDCKTILRALGP' da região C-terminal do antígeno p24 (resíduos de 196 a 207), mais especificamente na α -hélice 10. A interface total de interação compreende uma área de 1140 Å². Ambas as cadeias leve e pesada participam da interação com o antígeno, mantida principalmente por empilhamento de cadeias aromáticas na região N-terminal da α -hélice 10 e por múltiplas ligações de hidrogênio ao longo de uma face da α -hélice 10 (Figura 16).

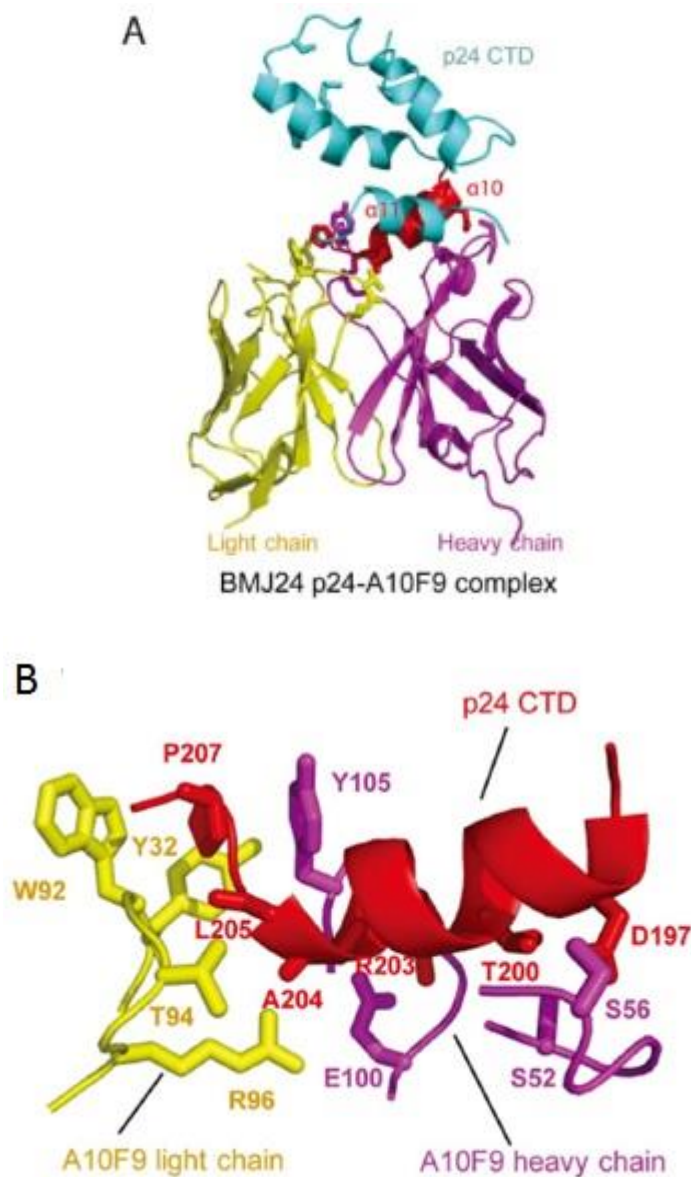


Figura 16: Representação tridimensional da interação entre FabA10F9 (cadeia leve em amarelo e cadeia pesada em roxo) e o domínio C-terminal de p24 (azul). A) A α -hélice 10 está representada em vermelho. Os resíduos que participam da interação estão representados em bastões, com destaque para as tirosinas que interagem com o antígeno por empilhamento de cadeias aromáticas. B) Visão detalhada da interação FabA10F9-p24 (retirado de Gu *et al.* 2013).

Os autores dão destaque para o resíduo P207 do antígeno (o mesmo apontado como sendo importante na interação entre p24 e Fab13B5) como tendo um papel crítico para a ancoragem do domínio C-terminal ao FabA10F9. A estrutura em forma de anel da prolina 207 interage com os resíduos Y105 da cadeia pesada e W92 e Y32 da cadeia leve do Fab, que formam uma espécie de “jaula” para a P207. Tal conformação ocorre na alça que liga as α -hélices 10 e 11, levando a crer que ela é importante para a estabilização do complexo como um todo (Figura 16B).

Na extremidade N-terminal da sequência descrita como o epítipo do FabA10F9, o resíduo D197 também possui um papel importante na interação com o anticorpo. O ácido aspártico possui uma cadeia lateral com um grupo carboxila carregada negativamente, que age como um bom aceptor de prótons e tende a interagir com resíduos doadores de prótons e resíduos polares. O resíduo D197 forma 5 ligações de hidrogênio com nitrogênios da cadeia principal de serinas (S) e glicinas (G) adjacentes e com o oxigênio de cadeias laterais das serinas 52 e 56 do FabA10F9 (Figura 17).



Figura 17: Representação tridimensional das ligações de hidrogênio formadas entre o resíduo D197 do antígeno p24 (azul) e quatro resíduos da cadeia pesada do Fab A10F9 (amarelo).

No mesmo estudo, também foram realizados ensaios ELISA utilizando o antígeno p24 e diferentes mutantes de Fab10AF9, contendo substituições pontuais de resíduos contidos no epítipo reconhecido pelo Fab, a fim de verificar a perturbação causada por cada mutação na formação do complexo. Gu e colaboradores realizou substituições dos resíduos T200 e R203 do epítipo por alanina, a fim de quebrar as ligações de hidrogênio com os resíduos S52-H e G103-H de Fab10AF9 respectivamente. Em ambos os casos, houve perda da afinidade pelo Fab, mais significativa na mutação R203A (Figura 18). Ambos os resíduos T200 e R203 apresentam variações em alguns subtipos de HIV-1

(notavelmente, T200 substituído por lisina nos subtipos BF, BF1, F1 e B, predominantes no Brasil). Mutantes com substituições nos resíduos D197 e L205 por alaninas também resultaram em perda de afinidade entre o antígeno e o anticorpo. Tal resultado leva a crer que ambos os resíduos são importantes para a interação, sendo que D197 interage com o anticorpo por meio de múltiplas ligações de hidrogênio e L205, por meio de interações hidrofóbicas (Gu *et al.* 2013).

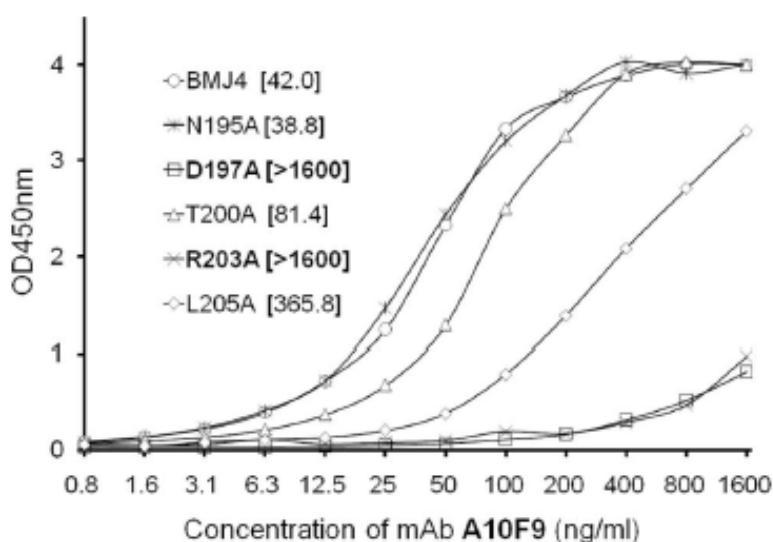


Figura 18: Gráfico de relação do sinal de ELISA (OD450nm) com a concentração de anticorpo FabA10F9 utilizado no teste. Os valores indicados são referentes a EC₅₀. BMJ4 refere-se ao antígeno p24 sem mutações (retirado de Gu *et al.* 2013).

Analisando o gráfico referente aos ensaios ELISA realizados por Gu *et al* (Figura), observa-se que as mutações R203A e D197A levaram à maior perda de afinidade entre antígeno e anticorpo, verificado pelo aumento acentuado no valor de EC₅₀. Tal resultado leva a crer que os dois resíduos são importantes para a afinidade entre antígeno e o Fab.

4.2.2.2. FabA10F9-p24 – Identificação dos pares de interação e variabilidade do epítipo

Na tabela 4, está representada a sequência do epítipo de p24 reconhecido pelo FabA10F9. Os resíduos que formam pares de interação com o antígeno, assim como os resíduos do antígeno que sofrem variação entre diferentes subtipos de HIV, estão em destaque. Os pares de interação formados na interface do complexo Fab-p24 foram identificados através das análises feitas com os programas *PDBePISA* e *LigPlot+*.

Apesar Gu e colaboradores atribuírem aos resíduos de D197 a P207 a identidade de epítipo reconhecido por FabA10F9, as análises da interface de interação a partir do

arquivo PDB 3VRL mostraram que resíduos do antígeno adjacentes a essa região, até N195 e E213, também formam pares de interação hidrofóbica com o anticorpo, especificamente com os resíduos S56, Y57 e Y59 da cadeia pesada. A tabela 4 apresenta apenas os resíduos presentes no epítipo descrito de FabA10F9.

Resíduos do anticorpo que interagem:	Resíduos do epítipo (p24):	Varição de resíduos do epítipo dentre subtipos de HIV-1:
S52-H (OG), S56-H (N, OG), G55-H (N), S53-H (N)	D197 (OD2, OD2, OD2, OD1)	
S52-H, G54-H, S56-H, Y57-H	D197	
Y57-H	C198	
S53-H (N)	T200 (OG1)	S (O2-AG, U), Q (O)
Y33-H, S52-H, S53-H,	T200	
Y57-H, T58-H	I201	
Y105-H	L202	
E100*-H (OE2), G103-H (O), N104-H (O), V106-H (N)	R203 (NH2, NH2, NE, O)	K (BF, BF1, F1, B, D, U, O)
E100-H, G101-H, G103-H, N104-H, Y105-H, V106-H	R203	
R96-L (NH1)	A204 (O)	G (F1)
V106-H, R96-L	A204	
S93-L, T94-L	L205	
Y105-H, W92-L	G206	
Y105-H, Y32-L, F93-L	P207	Q (C), S (F1), T (U)

Tabela 4: Nas duas primeiras colunas: Relação dos resíduos do anticorpo que interagem com os resíduos do epítipo de p24, por meio de ligações de hidrogênio (fundo azul) e interação hidrofóbica (fundo amarelo). Os átomos que participam das ligações de hidrogênio estão indicados entre parênteses. Os resíduos indicados por “-H” pertencem à cadeia pesada do anticorpo, enquanto os resíduos identificados por “-L” pertencem à cadeia leve. Na terceira coluna estão listadas as variações de aminoácidos para cada resíduo do epítipo, dentro de diferentes subtipos de HIV-1 (listados para cada variação entre parênteses). Substituições que modificam as propriedades de carga do mesmo estão destacadas em vermelho. *E100 forma uma ponte salina com R203.

Com relação às variações observadas em diferentes subtipos de HIV, destacam-se as mesmas que ocorrem na P207, também presente no epítipo reconhecido por

Fab13B5, assim como nos resíduos T200 e R203. Nos dois últimos casos, as substituições observadas abrangem aminoácidos pertencentes ao mesmo grupo, e portanto acredita-se que não interferiram de maneira significativa na interação.

4.2.2.3. FabA10F9-p24 – Ensaio de *docking* controles

Como controle positivo, foi feito um *docking* com a estrutura do complexo sem modificações. Verificou-se uma diferença significativa no número de ligações de hidrogênio e na área de interface de interação com relação ao complexo original não submetido ao *docking*. Nessa diferença, destacam-se as 5 ligações de hidrogênio feitas pelo resíduo D197 do antígeno na estrutura original em dímero, que não são observadas após o procedimento de *docking*. Tal diferença na interface de interação pode ser decorrente do fato do dímero cristalográfico ser estabilizado por uma interação entre as moléculas do antígeno (Figura 15), o que favorece uma conformação do complexo antígeno-anticorpo. Como os ensaios de *docking* são realizados considerando apenas uma cópia do complexo, sua interface pode estar sujeita a uma maior variação durante o procedimento de busca da conformação mais favorável para a associação entre as duas proteínas.

Como controle baseado em testes experimentais, foram introduzidas as mesmas mutações utilizadas nos testes realizados por Gu e colaboradores (Gu *et al.* 2013)., T200A, R203A, L205A e D197A, visando a quebra das ligações de hidrogênio observadas pelos autores e para verificar as mudanças nos valores de área de interface de interação e ΔG . Enquanto os autores realizaram testes com antígenos contendo cada mutação isoladamente, o teste de *docking* controle foi feito incorporando todas as variações simultaneamente.

Como controle negativo, foram escolhidos resíduos do anticorpo que formam ligações de hidrogênio através de sua cadeia lateral para serem substituídos por alaninas. Essas substituições têm por objetivo a quebra das ligações de hidrogênio formadas por esses resíduos e a verificação da interferência dessas quebras nos valores de ΔG e na área de interação após o *docking* (Tabela 5).

	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura original	H: 721.1, L: 231.6	H: -7.3, L: -2.7	H: 13, L: 2	H: 20, L: 6
Controle positivo	H: 660.4, L: 230.9	H: -10, L: -2.5	H: 5, L: 2	H: 18, L: 9
Controle experimental - T200A, R203A, L205A, D197A	H: 574.2, L: 232.3	H: -11.0, L: -1.7	H: 3, L: 3	H: 17, L: 8
	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Controle negativo – Y57A-L, E100A-H, S52A-H, S56A-H	H: 584.7, L: 233.2	H: -9.4, L: -2.5	H: 4, L: 2	H: 11, L: 9

Tabela 5: Valores de área da interface de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do FabA10F9 nos diferentes controles realizados.

A introdução das mutações realizadas em ensaios *in vitro* no trabalho de Gu e colaboradores levou a uma diminuição no número de ligações de hidrogênio, bem como na área da interface de interação (envolvendo a cadeia pesada) maior do que observada no controle positivo. Dentre os resíduos mutados, o único que manteve uma ligação de hidrogênio foi A203, que reproduziu a interação feita na estrutura original entre o oxigênio da cadeia principal de R203 com o nitrogênio da cadeia do resíduo V106-H do FabA10F9. Em relação ao controle negativo, também se observa uma redução no número dos pares de interação e na área da superfície de interface (Tabela 5).

4.2.2.4. FabA10F9-p24 – Ensaios de *docking* com variações no antígeno p24

Assim como no Fab13B5, o epítipo reconhecido por FabA10F9 também contém a prolina 207, descrita como sendo importante para a interação com o Fab13B5 através de interações hidrofóbicas. Além de P207, R203 e T200 também são resíduos demonstrados como sendo importantes para a interação com o FabA10F9 e que apresentam variação dentre subtipos de HIV-1 (Tabela 4). Levando em conta as variações observáveis em resíduos que realizam interações importantes para a formação do complexo, foram escolhidos os epítipos dos subtipos U, F1 e O de HIV para os ensaios de *docking*. Cada um desses epítipos apresenta variação em pelo menos dois dos resíduos acima citados.

	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura original	H: 721.1, L: 231.6	H: -7.3, L: -2.7	H: 13, L: 2	H: 20, L: 6
Controle positivo	H: 660.4, L: 230.9	H: -10, L: -2.5	H: 5, L: 2	H: 18, L: 9
Mutante p24: T200Q, R203K, P207T (U)	H: 656.3, L: 232.5	H: -10.3, L: -1.8	H: 4, L: 4	H: 17, L: 9
	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Mutante p24: R203K, A204G, P207S (F1)	H: 622.6, L: 217.9	H: -10.8, L: -1.1	H: 4, L: 3	H: 19, L: 7
Mutante p24: T200Q, R203K, T216V (O)	H: 651.5, L: 230.2	H: -11, L: -2.5	H: 5, L: 2	H: 17, L: 9

Tabela 6: Valores de área da interface de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio entre diferentes variações do antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do FabA10F9. Na primeira coluna, o subtipo de HIV correspondente às substituições introduzidas é indicado entre parênteses. Os resultados obtidos para a estrutura original e para o controle positivo são repetidos para facilitar a comparação.

Nos ensaios de *docking* utilizando os epítopos dos subtipos U e F1, houve perda de grande parte das ligações de hidrogênio, assim como ocorreu no controle positivo. A substituição do resíduo R203 por lisina não leva à quebra da ligação de hidrogênio feita com V106-H. A área do resíduo K203 de p24 (U, F1, O) em contato com o ligante também é semelhante à observada no resíduo original R203 (dados não mostrados), indicando que a substituição de R203 por uma lisina (observada nos três subtipos testados) não é significativa para interferir na ligação, apesar de o teste *in vitro* de mutação realizado por Gu *et al.* ter indicado que o resíduo R203 é importante para a interação com o Fab.

As variações no resíduo P207, da mesma forma que no complexo formado com Fab13B5, podem interferir no dobramento da cadeia peptídica do antígeno, uma vez que a prolina confere maior rigidez à cadeia. Novamente, foi observada uma nova ligação de hidrogênio envolvendo o resíduo que substitui a prolina 207 nos subtipos F1, U e O, especificamente com o resíduo W92-L. As áreas das interfaces não sofreram modificações significativas em relação ao controle positivo, com uma diminuição maior observada no variante F1.

4.2.3. Análise – Fab25.3

4.2.3.1. Fab25.3 – Análise preliminar da estrutura

Os dados de difração do cristal do Fab25.3 em complexo com o antígeno p24, foram analisados, em estudo de Momany e colaboradores (Momany *et al.*, 1996). Apesar de a resolução da estrutura obtida ter sido relativamente baixa (3.7 Å), a presença de hélices do domínio N-terminal de p24 foi confirmada por Ressonância Magnética Nuclear.

O anticorpo Fab25.3 reconhece um epítipo descontínuo na região N-terminal do antígeno p24. Tal região é formada por 5 α -hélices longas (A, B, C, D e G) e duas curtas (E e F), sendo que o epítipo reconhecido pelo anticorpo ocupa parte do C-terminal da hélice D, compreendendo NEEAAEWDRVLP, e dos resíduos 100-102 da hélice E. Apesar de ser raro que um anticorpo se ligue a um epítipo em forma de hélice, a área total de interação e o número de ligações de hidrogênio observados são comuns em interações antígeno-anticorpo.



Figura 19: Representação da estrutura tridimensional do complexo entre Fab25.3 e o antígeno p24, mostrando a região de interação. A cadeia pesada do Fab está representada em vermelho e a cadeia leve em rosa claro. No antígeno (azul), estão destacadas as sequências do epítipo contidas na hélice D (roxo), que interage com as cadeias leve e pesada do Fab, e na hélice E (ciano), que interage com a cadeia leve do Fab.

Assim como no estudo da estrutura do FabA10F9, Momany e colaboradores observaram a formação de um dímero, ligado através do fragmento de antígeno, na estrutura do complexo Fab25.3-p24 (Figura 20). Segundo os autores, a área da interface entre as duas moléculas do antígeno é ligeiramente maior do que a de interação entre o anticorpo e o antígeno, de 795 \AA^2 . Entretanto, a área de interface do antígeno com o anticorpo possui mais ligações de hidrogênio intermoleculares, o que, segundo Momany e colaboradores, leva a crer que ambas as interações tenham afinidades parecidas.

Quatro regiões determinantes de complementariedade do anticorpo interagem com o antígeno, sendo duas da cadeia leve, CDR-L1 (resíduos L31-L36) e CDR-L3 (resíduos L96-L98), e duas da cadeia pesada, CDR-H2 (resíduo H50) e CDR-H3 (resíduos H99-H105). A análise da interface do complexo Fab25.3-p24 demonstra que há formação de pelo menos 12 ligações de hidrogênio, além de uma ponte salina entre R82 do antígeno e EH50 do CDR-H2 do Fab (Figura 21).

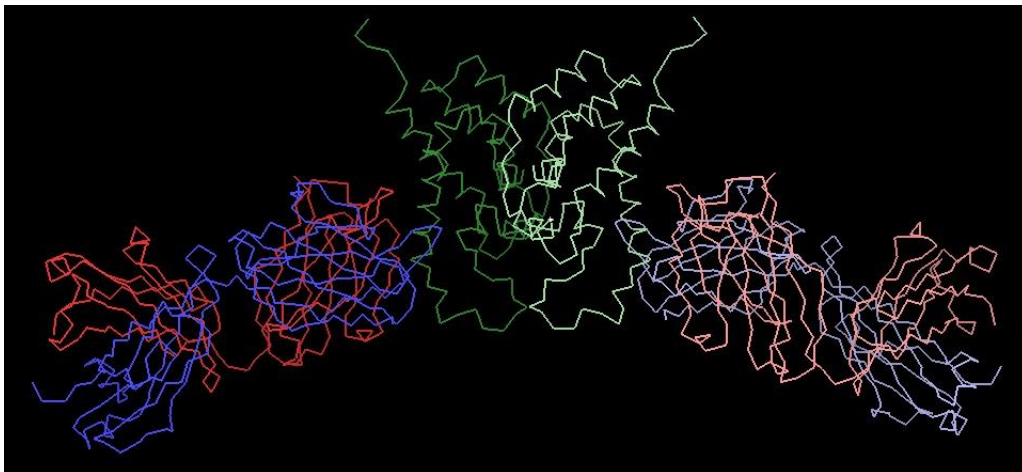


Figura 20: Representação tridimensional da estrutura de Fab25.3 em complexo com o domínio N-terminal do antígeno p24. Observa-se a formação de um dímero entre os complexos, através da associação das moléculas do antígeno (verde). As cadeias pesadas do Fab estão representadas em vermelho e as cadeias leves em azul (PDB: 1AFV) (Momany et al., 1996).

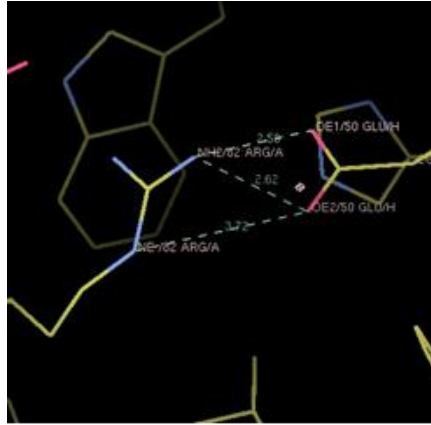


Figura 21: Representação tridimensional da formação de ponte salina entre os resíduos R82 de p24 e E50 de Fab25.3.

4.2.3.2. Fab25.3-p24 – Identificação dos pares de interação e variabilidade do epítipo

Abaixo, está representada a sequência do epítipo de p24 reconhecido pelo Fab25.3 (Tabela 7). Os resíduos que formam pares de interação com o antígeno, assim como os resíduos do antígeno que sofrem variação entre diferentes subtipos de HIV, estão em destaque. Os pares de interação formados na interface do complexo Fab-p24 foram identificados através das análises feitas com os programas *PDBePISA* e *LigPlot+*.

Na interface de interação entre o Fab25.3 e p24, ocorre a formação de uma ponte salina entre os resíduos E50 da cadeia pesada do Fab e R82 do antígeno p24. Esse resíduo não sofre nenhuma variação entre diferentes subtipos de HIV-1, entretanto os resíduos adjacentes D81 e L83 apresentam variações. Enquanto D81 é substituído por uma tirosina no HIV-1 subtipo BF, L83 é substituída por diferentes aminoácidos polares em diversos subtipos, inclusive em BF, BC e C (Tabela 7). Estas variações podem influenciar na conformação da cadeia e, conseqüentemente, na formação da ponte salina envolvendo o resíduo R82.

Resíduos do anticorpo que interagem:	Resíduos do epítopo (p24):	Variação de resíduos do epítopo dentre subtipos de HIV-1:
S103-H	T72	V (O), G (BF)
Y32-L (O)	N74 (ND2)	
Y32-L	N74	
S103-H, P104-H, I34-L	E75	
S103-H (OG), Y105-H (OH)	E76 (OE2, OE2)	
Y32-L	A77	
Y32-L, F36-L	A78	
W99-H (NE1)	E79 (OE2)	D (O)
Y99-H, Y105-H	E79	
N31-L (ND2), Y32-L (OH)	D81 (OD2, OD2)	Y (BF)
N32-L, Y32-L	D81	Y (BF)
E50-H (OE1, OE2)	R82 (NH2, NE)	
W99-H, K96-L, Q97L, V98-L, L100-L	R82	
N59-H, V98-L	L83	V (BC, C), F (BF), I (O2-AG), S (O)
E97-L, V98-L	P85	T (BF)
N31-L (OD1)	R100 (NH2)	T (O)
N31-L, Y32-L	R100	T (O)
Y32-L	G101	
Y32-L (OH, OH)	S102 (N, OG)	
Y32-L	S102	

Tabela 7: Nas duas primeiras colunas: Relação dos resíduos do anticorpo que interagem com os resíduos do epítopo de p24, por meio de ligações de hidrogênio (fundo azul) e interação hidrofóbica (fundo amarelo). Os átomos que participam das ligações de hidrogênio estão indicados entre parênteses. Os resíduos indicados por “-H” pertencem à cadeia pesada do anticorpo, enquanto os resíduos identificados por “-L” pertencem à cadeia leve. Na terceira coluna estão listadas as variações de aminoácidos para cada resíduo do epítopo, dentro de diferentes subtipos de HIV-1 (listados para cada variação entre parênteses). Substituições que modificam as propriedades de carga do mesmo estão destacadas em vermelho.

Dentre as variações encontradas na região do epítopo reconhecido pelo Fab25.3, há predominância de substituições observáveis em vírus do subtipo O e BF. O único resíduo que apresenta variações dentre outros subtipos de HIV (BC, C e O2-AG) é o

resíduo L83. Nesses subtipos, a leucina é substituída por outro aminoácido apolar de cadeia lateral curta, o que provavelmente não causaria uma interferência significativa nas interações hidrofóbicas feitas pelo resíduo. Na variação observada no subtipo BF, porém, o resíduo L83 é substituído por um resíduo de cadeia lateral polar.

4.2.3.3. Fab25.3-p24 – Ensaio de *docking* controles

Como controle positivo, a estrutura original do complexo Fab25.3-p24 foi submetida a um *docking* sem nenhuma modificação nas sequências das cadeias. Como controle negativo, resíduos do anticorpo que formam ligações de hidrogênio através de suas cadeias laterais foram substituídos por alaninas.

O controle positivo apresentou diminuição na área da interface de interação do antígeno com as cadeias pesada e leve do Fab25.3, e a ponte salina entre os resíduos R82 de p24 e E50-H foi mantida. Assim como observado para o complexo p24-FabA10F9 o fato da estrutura cristalográfica apresentar um dímero do complexo estabilizado pela associação entre as moléculas do antígeno deve ser a causa da maior diferença observada entre os resultados das análises da estrutura original e do controle positivo. A análise da interface do complexo no controle negativo apresentou diminuição nas áreas de contato, maior do que a observada no controle positivo.

	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura original	H: 328.5, L: 409.7	H: -0.1, L: -5.1	H: 5, L: 7	H: 7, L: 14
Controle positivo	H: 306.7, L: 359.1	H: -1, L: -4.1	H: 6, L: 3	H: 8, L: 9
Controle negativo: N31A-L, Y32A-L, E50A-H, W99A-H, S103A-H, Y105A-H	H: 287.8, L: 323.4	H: -2.9, L: -5.7	H: 1, L: 2	H: 5, L: 12

Tabela 8: Valores de área da interface de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do Fab25.3 nos diferentes controles realizados.

4.2.3.4. Fab25.3-p243 – Ensaio de *docking* com variações no antígeno p24

Os antígenos p24 provenientes do vírus dos subtipos BF e O são os que mais apresentam variação ao longo do epítipo reconhecido por Fab25.3. A estrutura do complexo descrita no trabalho de Momany *et al.*, 2000, mostra que todos os resíduos que

apresentam variação dentro destes subtipos de HIV estão envolvidos em interações com o anticorpo por ligação de hidrogênio envolvendo as cadeias laterais dos resíduos ou interação hidrofóbica. Dessa forma, os epítomos dos subtipos BF e O foram escolhidos para a realização de um teste de *docking* para análise da interferência das variações na interação com o Fab. No subtipo BF, há variação nos resíduos D81 e L83, adjacentes ao resíduo R82, que forma uma ponte salina com um resíduo do Fab.

O teste de *docking* envolvendo o epítomo referente aos subtipos O e BF levou a um ligeiro aumento da interface de interação, assim como no número de interações hidrofóbicas, quando comparado ao controle positivo, tanto na cadeia leve quanto na cadeia pesada. Também ocorreu quebra da ponte salina realizada entre os resíduos R82 de p24 e E50-H.

	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura original	H: 328.5, L: 409.7	H: -0.1, L: -5.1	H: 5, L: 7	H: 10, L: 18
Controle positivo	H: 306.7, L: 359.1	H: -1, L: -4.1	H: 6, L: 3	H: 9, L: 14
Mutante p24: T72G, D81Y, L83F (BF)	H: 370.2, L: 356	H: -1.7, L: -4.1	H: 3, L: 3	H: 9, L: 9
Mutante p24: T72V, E79D, L83S, R100T (O)	H: 347, L: 388.5	H: -2.3, L: -4	H: 3, L: 4	H: 11, L: 15

Tabela 9: Valores de área da interface de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio entre diferentes variações do antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do Fab25.3. Na primeira coluna, o subtipo de HIV correspondente às substituições introduzidas é indicado entre parênteses. Os resultados obtidos para a estrutura original e para o controle positivo são repetidos para facilitar a comparação.

4.2.4. Análise - FabCB41

4.2.4.1. FabCB41-p24 – Análise preliminar da estrutura

A estrutura tridimensional obtida para o complexo entre FabCB41 e o seu epítomo, ao contrário das estruturas apresentadas anteriormente, envolve apenas a cadeia polipeptídica que inclui os resíduos que interagem com o anticorpo. O estudo de Keitel e colaboradores (Keitel *et al.*, 1997), teve como objetivo verificar a interação do FabCB41 com diferentes peptídeos, para testar a sua poliespecificidade e propensão a reações cruzadas.

Além do peptídeo derivado do antígeno, de sequência GATPQDLNTL (e-pep), também foram testadas as interações com um peptídeo homólogo GATPEDLNQKLAGN (h-pep) e outros dois peptídeos não relacionados com o antígeno. Enquanto os peptídeos e-pep e h-pep, após a formação do complexo, adotaram conformações parecidas (Figura 18), formando ligações com os mesmos resíduos do anticorpo, os peptídeos não-homólogos ao epítipo também formaram complexos com o anticorpo, porém em conformações diferentes e interagindo com resíduos diferentes. Tal fato levou os autores a concluir que o anticorpo FabCB41 apresenta poliespecificidade, em que diferentes moléculas podem ligar-se ao anticorpo, não de maneira a reproduzir a interação com o seu ligante natural, mas adotando outros padrões de contato.

Os autores destacam, na interface de interação entre e-pep e h-pep e o FabCB41, a projeção do resíduo D6 do peptídeo (D35 no antígeno p24) para formação de uma interação importante, que só pode ser reproduzida por um glutamato, e L7 (L36 no antígeno), que não pode ser substituído por nenhum outro aminoácido para manter a interação antígeno-anticorpo (Figura 20). Tais conclusões foram tiradas com base em ensaios ELISA realizados com substituições pontuais de resíduos do antígeno (Kramer *et al.*, 1996). Interações hidrofóbicas e de Van der Waals também são observadas na formação do complexo, em que há contatos envolvendo cadeias laterais de resíduos de CDRs das cadeias leve e pesada do FabCB41.

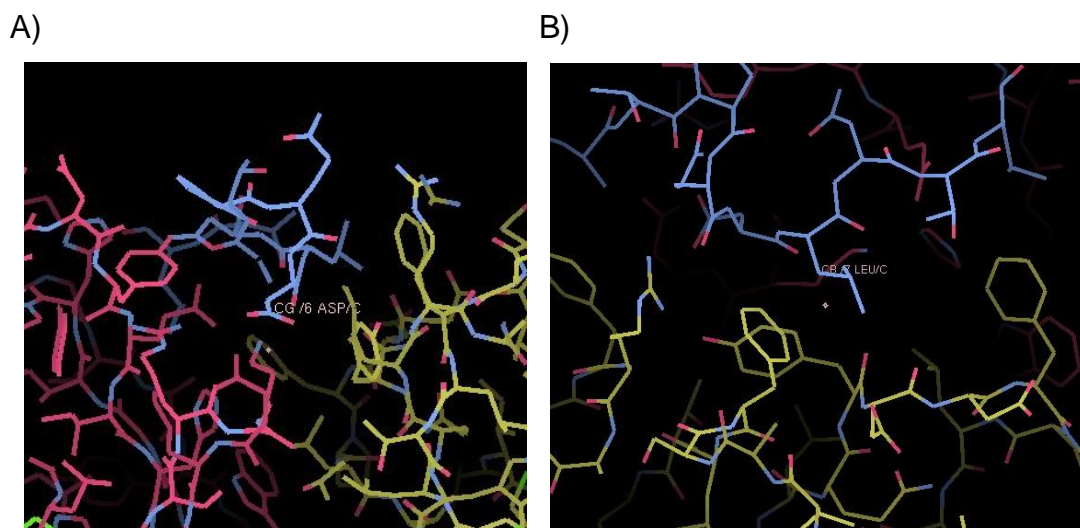


Figura 20: Representação tridimensional da interface de interação entre o epítipo (azul) e o anticorpo, cadeias leve (rosa) e pesada (amarelo). A) Projeção do resíduo D6 por entre as cadeias leve e pesada do FabCB41. B) Conformação do resíduo L7 na região de interação, próximo a resíduos aromáticos da cadeia pesada.

4.2.4.2. FabCB41-p24 – Identificação dos pares de interação e variabilidade do epítopo

Abaixo, está representada a sequência do epítopo de p24 reconhecido pelo FabCB41 (Tabela 10). Os resíduos que formam pares de interação com o antígeno, assim como os resíduos do antígeno que sofrem variação entre diferentes subtipos de HIV, estão em destaque. Os pares de interação formados na interface do complexo Fab-p24 foram identificados através das análises feitas com os programas *PDBePISA* e *LigPlot+*. O epítopo reconhecido pelo FabCB41 é o que apresenta menos variações, levando-se em conta os diferentes subtipos de HIV-1, dentre os epítopos analisados no presente trabalho.

Nenhum dos resíduos do peptídeo derivado do antígeno apontados como sendo importantes para a interação com o FabCB41 apresenta variação entre subtipos de HIV-1. Há apenas duas variações observadas, em dois subtipos diferentes. Enquanto o resíduo A31 é substituído por uma glicina em HIV do subtipo BF1, T38 é substituído por uma metionina em HIV do subtipo O2-AG. Apesar de ser uma variação que muda a característica da cadeia lateral, o resíduo T38 faz apenas uma interação hidrofóbica com o anticorpo, além de o subtipo recombinante O2-AG ser de rara ocorrência em infecções no Brasil.

4.2.4.3. FabCB41-p24 – Ensaio de *docking* controles

No controle positivo, em que foi realizado *docking* da estrutura do complexo original, não foram observadas diferenças significativas com relação à área de interface de interação e no número de interações hidrofóbicas (Tabela 11).

Ainda, foi feito um ensaio de *docking* com base em dados experimentais do FabCB41, substituindo os resíduos D6 e L7 do peptídeo e-pep (correspondentes a D35 e L36 no antígeno p24), visando o rompimento das ligações descritas por Keitel e colaboradores como sendo importantes para a ligação com o anticorpo. Enquanto D35 foi substituída por uma alanina, para evitar a formação de interações polares com as cadeias pesada e leve do anticorpo, L36 foi substituída por uma arginina, um aminoácido de cadeia lateral longa e carregada.

Resíduos do anticorpo que interagem:	Resíduos do epítipo (p24):	Varição de resíduos do epítipo dentre subtipos de HIV-1:
D100-H (OE1), Y101-H (OH), Y49-L (OH)	G30 (N, N, O)	
Q1-H	G30	
Y32-H (OH), R98-H (NH2)	A31 (O, O)	G (BF1)
Y32-H, D100-H, Y49-L	A31	
Y32-H	T32	
D31-H, Y32-H	P33	
F32-L, R50-L	Q34	
K99-H (NZ)	D35 (O)	
K99-H, D100-H, Y91-L	D35	
K99-H (NZ)	L36 (O)	
F32-L, R50-L, D92-L	L36	
D31-H (O)	N37 (ND2)	
D31-H, Y32-H, E33-H	N37	
E33-H	T38	M (O2-AG)
E33-H, H52-H, S55-H, A59-H, F94-L	L39	

Tabela 10: Nas duas primeiras colunas: Relação dos resíduos do anticorpo que interagem com os resíduos do epítipo de p24, por meio de ligações de hidrogênio (fundo azul) e interação hidrofóbica (fundo amarelo). Os átomos que participam das ligações de hidrogênio estão indicados entre parênteses. Os resíduos indicados por “-H” pertencem à cadeia pesada do anticorpo, enquanto os resíduos identificados por “-L” pertencem à cadeia leve. Entre parênteses estão identificados os átomos do respectivo resíduo que participam de ligações de hidrogênio. Na terceira coluna estão listadas as variações de aminoácidos para cada resíduo do epítipo, dentro de diferentes subtipos de HIV-1 (listados para cada variação entre parênteses). Substituições que modificam as propriedades de carga do mesmo estão destacadas em vermelho.

Como os autores descrevem o resíduo L36 como sendo essencial para garantir a estabilidade do complexo, a substituição por arginina consiste-se em uma mudança significativa na cadeia lateral desse resíduo, buscando a maior interferência nas interações feitas por ele. No controle baseado em dados experimentais, houve ligeira diminuição no valor de ΔG da interface entre o peptídeo e a cadeia leve do FabCB41, assim como na área de interface de interação quando comparada com o controle positivo. Entretanto, a grande alteração na afinidade do complexo observada pelos autores com a

mutação do resíduo L36 não foi reproduzida com o ensaio de *docking*. Como já observado na análise da interação entre p24 e FabA10F9 que procurava reproduzir os dados experimentais obtidos para mutações que causavam drástica diminuição na afinidade antígeno-anticorpo.

	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura original	H: 416.9, L: 277	H: -1.4, L: -4	H: 10, L: 1	H: 16, L: 8
Controle positivo	H: 417.3, L: 250.8	H: -0.1, L: -4.5	H: 10, L: 1	H: 15, L: 6
Controle experimental - D35A, L36R	H: 399, L: 266	H: -0.9, L: -2.8	H: 10, L: 1	H: 15, L: 7
Controle negativo – D100A-H, Y101A-H, Y49A-L, K99A-H,	H: 395.1, L: 255.9	H: -0.8, L: -3.8	H: 8, L: 2	H: 15, L: 6

Tabela 11: Valores de área da interface de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do FabCB41 nos diferentes controles realizados.

4.2.4.4. FabCB41-p24 – Ensaio de *docking* com variações no antígeno p24

As duas únicas variações presentes no epítipo reconhecido pelo FabCB41 foram reproduzidas em mutações para a realização de ensaios de *docking* molecular. Espera-se que não haja mudanças significativas na interação antígeno-anticorpo, uma vez que o resíduo T38 participa apenas de uma interação hidrofóbica e a substituição de A31 por G não gera mudança significativa na cadeia lateral do resíduo.

	Área da interface de interação (Å ²)	ΔG (kcal/mol)	Nº de ligações de hidrogênio	Nº de interações hidrofóbicas
Estrutura original	H: 416.9, L: 277	H: -1.4, L: -4	H: 10, L: 1	H: 16, L: 8
Controle positivo	H: 417.3, L: 250.8	H: -0.1, L: -4.5	H: 10, L: 1	H: 15, L: 6
Mutante p24: A31G (BF1)	H: 408.0, L: 230	H: 0, L: -4.1	H: 10, L: 1	H: 15, L: 6
Mutante p24: T38M (O2-AG)	H: 417.7, L: 244.8	H: -0.1, L: -4.7	H: 10, L: 1	H: 16, L: 7

Tabela 12: Valores de área da interface de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio entre diferentes variações do antígeno p24 e as cadeias pesada (H) e leve (L) do FabCB41. Na primeira coluna, o subtipo de HIV correspondente às substituições introduzidas é indicado entre parênteses. Os resultados obtidos para a estrutura original e para o controle positivo são repetidos para facilitar a comparação.

Não foram observadas alterações significativas nos valores de área de interação, ΔG e número de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas nos testes de substituição quando comparados ao controle, apenas ligeira diminuição na área de interação observada no complexo com o epítipo do subtipo BF1.

5. DISCUSSÃO

Análises *in silico* de interação entre antígeno e anticorpo são importantes para a realização de estudos iniciais de otimização de anticorpos. Tais análises podem ser feitas com o auxílio de estruturas disponíveis em bancos de dados e a revisão da literatura. No entanto, para toda análise computacional, é necessário estabelecer limites para a interpretação dos resultados. Assim, no presente trabalho, para a análise de cada interface de interação entre o fragmento de anticorpo e o antígeno, foram realizados testes controle, com o objetivo de auxiliar no estabelecimento desses limites.

Diversos fatores limitar a tomada de conclusões em análises estruturais e de interação de proteínas *in silico*. Primeiramente, 3 das 4 estruturas analisadas no presente trabalho foram resolvidas com uma resolução entre 3 Å e 4 Å. Esse valor é considerado baixo para a definição das cadeias laterais no processo de refinamento da estrutura a partir do mapa de densidade eletrônica. Porém, durante o processo de *docking*, as posições das cadeias laterais dos resíduos são aperfeiçoadas a fim de alcançar uma conformação energeticamente favorável.

Foi observada, nas estruturas dos complexos formados entre o antígeno p24 e os Fabs A10F9 e 25.3, a formação de dímeros cristalográficos, ambos estabilizados por meio de contatos entre os fragmentos do antígeno. Analisando as interfaces de interação entre as moléculas do antígeno na formação do dímero, verificou-se que elas compreendem uma área semelhante à da interação entre o antígeno e o Fab, sendo que também são formadas ligações de hidrogênio, indicando uma associação estável entre os complexos. Em ambos os casos, verificou-se uma diferença significativa na área da interface de interação entre antígeno e anticorpo (mais acentuada no caso do FabA10F9) quando comparamos a análise feita a partir da estrutura original e os chamados controles positivos (mesma estrutura submetida ao procedimento de *docking*). Tal diferença pode ser decorrente do fato do dímero cristalográfico favorecer uma conformação do complexo antígeno-anticorpo. Como os ensaios de *docking* são realizados considerando apenas uma cópia do complexo, sua interface pode estar sujeita a uma maior variação durante o

procedimento de busca da conformação mais favorável para a associação entre as duas proteínas.

Keitel e colaboradores (Keitel *et al.*, 1997) resolveu as estruturas do anticorpo FabCB41 ligado a cadeias polipeptídicas de 10 e 14 aminoácidos, representativas do epítipo de p24 reconhecido pelo anticorpo e uma sequência homóloga, respectivamente. Segundo o autor, tais cadeias podem ser utilizadas em testes *in vitro* de interação, uma vez que elas mantêm um certo nível de estrutura secundária semelhante ao que o epítipo apresenta quando anexado ao antígeno p24. Porém, o dobramento do domínio N-terminal do anticorpo inteiro, em sua estrutura terciária, além de possivelmente desencadear mudanças na estrutura local do epítipo, poderia também formar ligações novas com o antígeno, capazes de interferir na formação dos pares de interação feitos por resíduos contidos no peptídeo, consistindo em mais uma limitação do método utilizado para o objetivo de otimização do anticorpo FabCB41.

No estudo do complexo p24-FabA10F9 (Gu *et al.*, 2013), além da resolução da estrutura cristalográfica, também foram feitos testes de interação *in vitro* com diversos mutantes do antígeno. Os autores realizaram mutações pontuais, substituindo resíduos do antígeno por alaninas, para avaliar a perturbação que cada mutação causaria na interação. Introduzimos tais mutações testadas *in vitro* simultaneamente na estrutura do complexo FabA10F9-p24 para a realização do *docking* e das análises da interface de interação. Gu e colaboradores observaram que mutações nos resíduos D197 e R203 levaram à diminuição da afinidade do antígeno com o Fab da ordem de 40 vezes, aferida por meio do EC₅₀ em teste ELISA. Tamanha alteração indica uma perda significativa na afinidade do complexo, entretanto não pudemos reproduzir tais resultados *in silico*.

Em um ensaio de *docking* molecular, é feita uma busca local na interface de interação entre duas proteínas visando à minimização de energia do complexo. Esse processo dificilmente conseguirá reproduzir o que se observa em ensaios ELISA, realizados para testar substituições pontuais de resíduos do antígeno, em que uma única mutação pode abolir a interação com o anticorpo. Geralmente, ferramentas de bioinformática que permitem calcular/estimar a energia de interação entre duas moléculas é utilizada em *screenings*, para selecionar as moléculas dentro de uma larga biblioteca virtual para testes subsequentes. Como feito por Kiyoshi e colaboradores (Kiyoshi *et al.*, 2014), que utilizou a ferramenta *Einteract*, do pacote de programas *MOE*, para realizar esse tipo de triagem dentro de uma biblioteca de 117800 modelos.

Na metodologia utilizada no presente trabalho, esperou-se observar uma diferença nos valores da área de superfície de interação (Å²) e número de interações entre resíduos

da interface. Entretanto, como foi possível observar nos testes realizados com o complexo p24-FabA10F9, as diferenças observadas nesses valores não reproduzem claramente a perda de afinidade observada no teste de ELISA, que chegou a descrever a perda de afinidade do complexo em um fator de 40 vezes. É importante observar que tal fato não se consiste em uma limitação para o uso do *docking molecular* como uma ferramenta de triagem.

Com relação às variações nos resíduos dos epítomos descritos no presente trabalho, foram testadas em ensaios de *docking* aquelas tidas como críticas para a interação do epítomo em especial. De maneira geral, os fragmentos de anticorpos Fab13B5 e FabCB41 apresentam menos variação do que FabA10F9 e Fab25.3. O epítomo do FabCB41 é o que possui menos variações dentre os 4 epítomos analisados. O subtipo de HIV-1 O2-AG, que inclui a única variação de resíduo significativa observada nesse epítomo de p24, já foi sequenciado pelo menos em 31 indivíduos infectados no Brasil, de acordo com registro no banco de dados de HIV Los Alamos (Foley *et al.*, 2013). O epítomo reconhecido por Fab13B5 apresenta algumas variações nos subtipos BC, BF1 e C, como no resíduo T200, por uma serina. Apesar de esses subtipos ocorrerem com mais frequência no Brasil do que os subtipos B, O e U, essa substituição não foi testada no presente trabalho, uma vez que a cadeia lateral da treonina assemelha-se em tamanho e polaridade com a da serina. Além disso, o resíduo T200 não sofreu mudança conformacional significativa com a ligação do anticorpo, nas análises estruturais feitas por Monaco-Malbet e colaboradores (Monaco-Malbet *et al.* 2000).

Os estudos de ambas as estruturas de Fab13B5 e FabA10F9 ligados aos seus antígenos destacaram o papel do resíduo P207 de p24 na estabilidade do complexo. Enquanto a ligação com Fab13B5 provocou uma mudança conformacional significativa no resíduo, a ligação com o FabA10F9 mostra a formação de um bolsão hidrofóbico ao redor de P207. O resíduo sofre substituição nos subtipos raros F1, O e U. As variações observadas no epítomo reconhecido pelo Fab 25.3, por sua vez, incluem principalmente os subtipos O e BF, também de rara frequência em indivíduos infectados no Brasil.

De forma geral, as análises de interação entre os fragmentos de anticorpos e os antígenos que incluem variações de resíduos participantes da interação não permitiram levar a escolha dos fragmentos de anticorpos mais adequados para o desenvolvimento de um diagnóstico de HIV-1. Na maioria dos testes de controle negativo realizados, o valor de ΔG das interfaces de interação não sofreu as variações esperadas que indicariam uma conformação menos favorável energeticamente.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou como objetivo realizar um estudo estrutural da interação entre diferentes fragmentos de anticorpos anti-p24 e o seu antígeno. Como discutido previamente, análises de interação molecular *in silico* podem ser ferramentas importantes para estudos iniciais de otimização de proteínas. A realização de testes de *docking* molecular e análises de interface de interação podem oferecer dados auxiliares na escolha de estratégias a serem utilizadas para testes *in vitro* de interação ou ainda para a construção de proteínas recombinantes.

A metodologia proposta no presente trabalho apresentou diversas limitações para a tomada de conclusões a respeito das análises realizadas. Foi verificado, através dos ensaios controle, que os testes de *docking* geram alterações na conformação da estrutura original, e a minimização de energia não necessariamente reproduz a conformação encontrada na estrutura cristalográfica. Além disso, os testes realizados incorporando substituições em resíduos específicos não forneceram resultados claros sobre o eventual impacto destas substituições na associação antígeno-anticorpo. Nos testes realizados, a observação da área da superfície de interação antígeno-anticorpo se consistiu no método de análise mais adequado, uma vez que as variações observadas nessa variável apresentaram um padrão paralelo ao observado aos controles baseados em testes experimentais.

Testes de interação de proteínas *in silico* sempre irão possuir limitações, e devem ser confirmados com ensaios experimentais. As análises de variação de cada epítipo dentro dos subtipos encontrados no Brasil, por sua vez, já oferecem informações que podem auxiliar em um estudo que busca a escolha de construções específicas para um teste de ELISA sanduíche. Por apresentarem menos variações que os outros dois Fabs em seus respectivos epítopos, os Fabs 13B5 e CB41 poderiam ser utilizados em testes *in vitro* de interação com os epítopos de sequências correspondentes a essas variações. Caso ainda se deseje realizar uma triagem de variações de antígenos através de ferramentas computacionais antes da realização de testes *in vitro* aplicando essas variações, a metodologia empregada deve ser refinada, testando diferentes ferramentas e realizando ensaios controle e utilizando dados experimentais como base para ser validada como uma representação satisfatória da dinâmica envolvida nas interações analisadas.

7. REFERÊNCIAS

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. e Walter P. **Molecular Biology of the Cell 5th Edition, Chapter 3.** 125-130

Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I, Lipman D.J., Ostell J e Sayers E.W. **GenBank.** *Nucleic Acid Res*, 2013. **41** 36-42

Berman H.M., Westbrook j., Feng z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. **The Protein Data Bank.** *Nucleic Acids Research*, 2000. **28** 235-242.

Burke D.S. **Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy.** *Emerging Infectious Diseases*, 1997. **3(3)** 253-59

Chudy M., Weber-Schehl M., Pichl L., Jork C., Kress J., Heiden M., Funk M.B. e Nübling C.M. **Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus type 1 may require two different amplification targets.** *Transfusion*, 2012. **52** 431-39

Clark S.A., Calef C. e Mellors J.W. **Mutations in retroviral genes associated with drug resistance.** *HIV sequence compendium*, 2007. 58-158. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/reviews.html>, acessado em 25/09/15.

Daskalakis D. **Perspective: HIV diagnostic testing: evolving technology and testing strategies.** *Top Antivir Med*, 2011. **19(1)** 18-22

Diskin R., Scheid J.F., Marcovecchio P.M., West Jr A.P., Klein F., Gao H., Gnanapragasam P.N.P., Abadir A., Seaman M.S., Nussensweig M.C. e Bjorkman P.J. **Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design.** *Science*, 2011. **334** 1289-1293

Domenech R. e Neira J.L. **The HIV-1 Capsid Protein as a Drug Target: Recent Advances and Future Prospects.** *Current Protein and peptide science*, 2013. **14 (8)** 658-668

Dominguez C., Beoelens R. e Bonvin A.M.J.J. **HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information.** *JACS*, 2003. **125** 1731-1737

Foley B, Leitner T, Apetrei C, Hahn B, Mizrahi I, Mullins J, Rambaut A, Wolinsky S, and Korber B. **HIV Sequence Compendium 2013** Eds. Published by Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 13-26007.

Frenzel A., Hust M. e Schirrmann T. **Expression of recombinant antibodies.** *Frontiers in Immunology*, 2013. **4** 217

Gu Y., Co F., Wang L., Hou W., Zhang J., Hew C. Li S., Yuan A. e Xia N. **Structure of a novel shoulder-to-shoulder p24 dimer in complex with the broad-spectrum antibody A10F9 and its implication in capsid assembly.** *PLoSOne*, 2013. **8(4)** 1-11

Gullet J.C. e Nolte F.S. **Quantitative nucleic acid amplification methods for viral infections.** *Clinical Chemistry*, 2015. **61(1)** 72-78

Gray J.J., Moughon S., Wang C., Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C.A. e Baker D. **Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid body displacement and side-chain conformations.** *J Mol Biol*, 2003. **331** 281-299

Gres A.T., Kirby K.A., Kewal Ramani V.N., Tanner J.J., Pornillos O. e Sarafianos S.G. **STRUCTURAL VIROLOGY. X-ray crystal structures of native HIV-1 capsid protein reveal conformational variability.** *Science*, 2015. **349 (6243)** 99-103

Hans R. e Marwaha N. **Nucleic acid testing benefits and constraints.** *Asian J Transfus Sci*, 2014. **8 (1)** 2-3

Hinz A., Hulsik D.L., Forsman A., Koh W.L., Belrhali H., Gorlani A., De Haard H., Weiss R.A., Verrips T. e W. Weissenhorn. **Crystal Structure of the Neutralizing Llama Vhh D7 and Its Mode of HIV-1 gp120 Interaction.** *PLoS ONE*, 2010. **5(5)** 1-7

Janeway C.A., Travers C., Walport M. e Shlomchik M.J. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition, 2001.**

Keitel T., Kramer A., Wessner H., Scholz C., Schneider-Mergener J. E Hohne W. **Christalographic Analys of Anti-P24 (HIV-1) Monoclonal Antibody Cross-Reactivity and Polyspecificity.** *Cell*, 1997. **91** 811-820

Kiyoshi M., Caaveiro J.M.M., Miura E., Nagatoishi S., Nakakido M., Soga S., Shirai H., Kawabata S. e Tsumoto K. **Affinity Improvement of a Therapeutic Antibody by Structure-Based Computational Design: Generation of Electrostatic Interactions in the Transition State Stabilizes the Antibody-Antigen Complex.** *PLOS One Abs Optimizationm*, 2014 **9(1)** 1-9

Kramer A., Keitel T., Winkler K., Stocklein W., Hohne W. e Schneider-Mergener J. **Molecular Basis for the binding promiscuity of na anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody.** *Cell*, 1996. **91** 799-809

Krissinel E. e Henrick K. **Protein interfaces, surfaces and assemblies service PISA at the European Bioinformatics Institute.** *J Mol Biol*, 2007. **372** 774-797

Laskowski R.A. e Swindells M.B. **LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery.** *J. Chem. Inf. Model.* 2011. **51**, 2778-2786

Leitner T., Korber B., Daniels M., Calef C. e Foley B. **HIV-1 subtype and circulating recombinant form (CRF) reference sequences.** *HIV sequence compendium*, 2005. 41-48. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/reviews.html>, acessado em 25/09/15.

Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L.J. e Weis-Garcia F. **Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.** *ILAR J*, 2005. **46(3)** 258-268

Lohkamp B., Emsley P. e Cowtan K. **Coot News.** *CCP4 Newsletter*, 2005. **42** 7

Lyskov S. E Gray J.J. **The RosettaDock server for local protein-protein docking.** *Nucleic Acids Research*, 2008. **36** 233-238

Ministério da Saúde, Brasil. **Boletim epidemiológico HIV e AIDS.** Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, AIDS e hepatitis virais, 2014. <http://www.aids.gov.br/publicacao/2014/boletim-epidemiologico-2014>, acessado em 23/09/15.

Momany C., Kovari L.C., Prongay A.J., Keller W., Gitti R.K., Lee B.M., Gorbalenya A.E., Tong L., McClure J., Ehrlich L.S., Summers M.F., Carter C. e Rossmann M.G. **Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein.** *Nature Structural Biology*, 1996. **3(9)** 763-770

Monaco-Malbet S., Berthet-Colominas C., Novelli A., Battai N., Piga N., Cheynet V., Mallet F. e Cusack S. **Mutual Conformation Adaptations in Antigen and Antibody upon Complex Formation between an Fab and HIV-1 capsid protein p24.** *Structure*, 2000. **8** 1069-1077

Mühlbacher A., Schennach H., van Helden J., Hebell T., Pantaleo G., Bürgisser P., Cellerai C., Permpikul P., Rodriguez M.I., Eiras A., Alborino F., Cunningham P., Axelsson M., Andersson S., Wetlitzky O., Kaiser C., Möller C e de Sousa G. **Performance evaluation of a new fourth-generation HIV combination antigen-antibody assay.** *Med Microbiol Immunol*, 2013. **202** 77-86

Nelson D.L. e Cox M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger, 5a edição, 2011.** 72-85

Organização das Nações Unidas. **Fact sheet: global statictics.** UNAIDS, 2014. http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015/20150714_factsheet, acessado em 23/09/15.

Pantazes R.J., Grisewood M.J., Li T., Gifford N.P. E Maranas C.D. **The iterative protein redesign and optimization (IPRO) suite of programs.** *Journal of Comp. Chemistry*, 2015. **36** 251-263

Paul W.E. **Fundamental Immunology, 7th Edition, Chapter 5.** 134-139

Pommié C., Levadoux S., Sabatier R., Lefranc G. e Lefranc M.P. **IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-Region aminoacid properties.** *J Mol Recognit*, 2004. **17(1)** 17-32

Rhodes G. **Chrystallography Made Crystal Clear 3rd Edition, Chapter 2.** 7-16

Russel P.J. **iGenetics, A Molecular Approach, 3th Edition**

Sanabani S.S., Pessoa R., Oliveira A.C.S., Martinez V.P., Giret M.T.M., Succi R.C.M., Carvalho K., Tomiyama C.S., Nixon D.F., Sabino E.C. e Kallas E.G. **Variability of HIV-1 genomes among children and adolescents from São Paulo, Brazil.** *PLOS One*, 2013. **8(5)**

Schrödinger, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8**

Tiwari R.P., Jain A., Khan Z., Kumar P., Bhrigu V. e Bisen P.S. **Designing of novel antigenic peptide cocktail for the detection of antibodies to HIV 1/2 by ELISA.** *Journal of Immunological Methods*, 2012. **387** 157-66

Van Vranken D. e Weiss G. **Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology, 2013, Chapter 5.** 180-185

Van Zundert. G.C.P., Rodrigues J.P.G.L.M., Trellet M., Schmitz C., Kastiris P.L., Karaca E., Melquiond A.S.J., Van Dijk M., De Vries S.J. e Bonvin A.M.J.J. **The HADDOCK 2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes.** *J Mol Biol*, 2006. **428** 720-725

Vetter B.N., Orłowski V., Niederhauser C., Walter L. Schupbach J. **Impact of naturally occurring amino acid variations on the detection of HIV-1 p24 in diagnostic antigen tests.** *BMC Infect Dis.*, 2015. **15** 468

Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., Unger M., Juarez K., Urrutia M., Cauherff A., Danquah W., Rissiek B., Scheuplain F., Schwarz N., Adriouch S., Boyer O., Seman M., Licea A., Serreze D.V., Goldbaum F.A., Haag F. e Koch-Nolte F. **Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.** *Med Microbiol Immunol*, 2009. **198** 157-74

Zhao G. Perilla J.R., Yufenyuy E.L., Meng X., Chen B., Ning J., Ahn J., Gronenborn A.M., Schulten K., Aiken C. e Zhang P. **Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics.** *Nature*, 2013. **497 (7451)** 663-646