

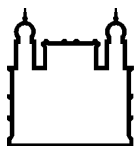
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

ANÁLISE DA DISSOCIAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS H-2 DE
CLASSE I E EPÍTOPOS DA EXTENSÃO COOH-TERMINAL DA CPB
DE *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*.

ARTUR ANTÔNIO MELO DE LIRA BRANDT

Rio de Janeiro
Dezembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional de Sistemas

ARTUR ANTÔNIO MELO DE LIRA BRANDT

Análise da Dissociação entre as Proteínas H-2 de Classe I e Epítomos da Extensão COOH-Terminal da CPB de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Computacional de Sistema

Orientador (es): Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena
Prof. Dr. Carlos Roberto Alves

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2015

**Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ**

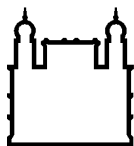
B821 Brandt, Artur Antônio Melo de Lira

Análise da dissociação entre as proteínas H-2 de classe I e epítomos da extensão COOH-terminal da CPB de *Leishmania (L.) amazonensis* / Artur Antônio Melo de Lira Brandt. – Rio de Janeiro, 2015.
xv, 102 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2015.
Bibliografia: f. 90-96

1. Superfície de energia livre. 2. Haplótipos H-2 D^b, H-2 K^d, H-2 K^k e H-2 L^d. 3. *Leishmania (L.) amazonensis*. 4. Dinâmica molecular. 5. Metadinâmica. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

AUTOR: ARTUR ANTÔNIO MELO DE LIRA BRANDT

Análise da Dissociação entre as Proteínas H-2 de Classe I e Epítomos da Extensão COOH-Terminal da CPB de *Leishmania (L.) amazonensis*.

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena
Prof. Dr. Carlos Roberto Alves**

Aprovada em: 11/12/2015

EXAMINADORES:

**Prof. Dr. Fábio Passetti - Presidente (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Diego Enry Barreto Gomes (INMETRO/RJ)
Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior (IOC/FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha amada mulher Andréa, por todo o apoio, paciência e incentivo para que eu pudesse concluir o curso de Doutorado. Suas palavras de estímulo foram muito importantes para mim, para que eu pudesse dar continuidade ao objetivo desse projeto de tese. Aos meus filhos Clara e Matheus por estarem sempre juntos a nós em todas as horas dessa vida, pelo amor e carinho que sentimos por eles e por todos os momentos alegres que nos proporcionam. Também dedico à minha mãe Adeilda por ter me proporcionado as oportunidades para realizar a minha formação humana e acadêmica e deste modo chegar a este momento de vida. Ao meu irmão Roberto (*in memoriam*) pelo seu incentivo e seu orgulho de me ver cursar esta pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Às instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Aos familiares:

Em especial a minha esposa Andréa Miranda Guedes, Matheus Guedes de Andrade (filho), Clara Guedes de Lira Brandt (filha), Adeilda Melo de Lira (mãe) e todas as pessoas de minha família pelo apoio que recebi durante o curso de Doutorado.

Aos amigos e colaboradores:

Paulo Ricardo Batista

Maurício Costa

João Hermínio Martins da Silva

Oswaldo Gonçalves Cruz

Amanda Sutter

Deborah Antunes

Janaína Cruz

Lucianna Helene Santos

Rafael Ferreira

Vanessa Silva

Lucas Machado

Bernardo Acácio Santini Perreira

Franklin Souza da Silva

Ana Carolina Guimarães

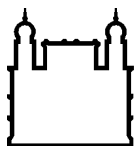
Aos orientadores:

Ernesto Raúl Caffarena

Carlos Roberto Alves

Ao revisor:

Fábio Passetti



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

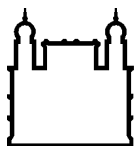
Análise da Dissociação entre as Proteínas H-2 de Classe I e Epítopos da Extensão COOH-Terminal da CPB de *Leishmania (L.) amazonensis*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

Artur Antônio Melo de Lira Brandt

Novas estratégias para controlar a infecção por *Leishmania* spp demandam um grande conhecimento a respeito de vários aspectos da doença e um entendimento dos eventos que ocorrem em escala molecular durante esta infecção. Uma das questões essenciais durante a infecção por *Leishmania* é a capacidade dos peptídeos derivados da região COOH-terminal da cisteíno-proteinase tipo B (CPB) da *Leishmania* de interagir com a fenda do MHC (complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *Major histocompatibility complex*) de classe I. Foi proposto que durante o estágio intracelular do parasito podem ocorrer interações entre fragmentos da região COOH-terminal da CPB e o sistema imune do hospedeiro vertebrado, especificamente com as proteínas do MHC de classe I. No modelo murino, a CPB da *Leishmania amazonensis* promove a regulação da resposta imune, e os fragmentos da sua extensão COOH-terminal (*cyspep*) são reportados como importantes fatores para a infecção. Peptídeos derivados da *cyspep* interagem com a proteína H-2 (MHC de camundongos) de classe I, e podem ter um papel chave na interação parasito-hospedeiro, sinalizando para clones específicos de linfócitos T. Neste trabalho, aplicamos uma abordagem de simulação da dinâmica molecular para estudar o processo de dissociação de sete peptídeos derivados da *cyspep*, previamente identificados como capazes de interagir com as proteínas H-2 de classe I. No entanto, o processo de saída de peptídeos da fenda da proteína H-2 é considerado um evento raro, e as simulações da dinâmica molecular tradicional não são capazes de reproduzir este processo em um tempo computacional factível. Aplicamos a metadinâmica (MetaD) para simular a dissociação desses peptídeos da fenda dos receptores H-2. Utilizando esta abordagem, fomos capazes de calcular a energia livre de dissociação correspondente a cada uma dos complexos e descrever, em escala molecular, o processo de saída dos peptídeos. Para testar a aplicabilidade desta abordagem, executamos as simulações de MetaD em um conjunto de validação composto de quatro estruturas cristalográficas H-2/peptídeos. Nossos resultados mostraram valores consistentes de $\Delta G_{\text{dissociação}}$ calculados pelos ensaios de MetaD, quando comparados com os valores obtidos do servidor PDBePISA. Exploramos o processo de dissociação dos peptídeos que formaram complexos com as proteínas H-2 L^d e D^b, e algumas das principais interações entre estes peptídeos e os receptores H-2 foram identificadas. As interações de hidrogênio mais persistentes ocorreram entre a região NH₂-terminal dos peptídeos e os resíduos da fenda das proteínas H-2, exceto para o complexo 11, onde não houve formação de ligações de hidrogênio com a região NH₂-terminal do peptídeo. Para o haplótipo D^b, observamos ligações de hidrogênio mais persistentes sendo mantidas entre o resíduo Glu63 da proteína e a região NH₂-terminal do peptídeo, corroborando que este resíduo é uma importante âncora para a ligação do peptídeo à proteína H-2. Para todos os complexos, observamos três regiões de influência da energia de interação intermolecular entre os peptídeos e a proteína. Isto sugere uma distância mínima (~25 Å) para que a interação entre os peptídeos e as proteínas H-2 concretamente ocorram.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Analysis of Dissociation Process between H-2 Class I Proteins and Epitopes from COOH-Terminal extension of CPB of *Leishmania (L.) amazonensis*

ABSTRACT

PHD THESIS IN COMPUTATIONAL BIOLOGY AND SYSTEMS

Artur Antônio Melo de Lira Brandt

New strategies to control *Leishmania* spp disease demand an extensive knowledge about several aspects of the infection and an understanding of its molecular events. One of the essential aspects of the *Leishmania* infection is capacity of peptides derived from cysteine-proteinase type B (CPB) to bind the cleft of the MHC (*Major histocompatibility complex*) Class I. It has been proposed that during intracellular life stage of the parasite, interactions occur between fragments from COOH-terminal region of CPB and immune system of the vertebrate host, specifically with MHC class I proteins. In murine models, CPB from *Leishmania amazonensis* promotes regulation of immune response, and fragments from its COOH-terminal extension (*cyspep*) are important factors during *Leishmania* infections. *Cyspep*-derived peptides interact with H-2 (murine MHC) class I proteins, and could play a key role in host-parasite interaction, signaling for specific lymphocyte T clones. In this work, we applied molecular dynamics simulations to study dissociation process for seven *cyspep*-derived peptides, previously identified as capable of interacting with H-2 class I proteins. However, the exit of peptides from the cleft of H-2 is a rare event, and standard molecular dynamics simulations are not able to mimic this process over a feasible computational time. We applied metadynamics (MetaD) to simulate dissociation of these peptides from the cleft of H-2 receptors. Using this approach, we were able to measure corresponding free energies of dissociation and describe the exit of peptides, at a molecular scale. To test the applicability of this approach, we perform MetaD on a validation set with four crystallographic H-2/peptide complexes. Our results showed consistent estimated values of $\Delta G_{\text{dissociation}}$, comparing with values obtained from PDBePISA webserver. We explored the dissociation process of peptides in complex with H-2 L^d and D^b proteins, and some main interactions between peptides and H-2 receptors were identified. The most persistent hydrogen bonds interaction occurred between NH₂-terminal region of peptides and residues from the cleft of H-2 proteins, except for complex 11, where no hydrogen bonds interactions with NH₂-terminal region of peptide were observed. For haplotype D^b, we observed persistent hydrogen bonds between residue Glu63 from H-2 protein and NH₂-terminal region of peptide, corroborating this residue as an important peptide anchor for binding to H-2 protein. For all complexes, three areas of the influence of non-bonded interactions were observed, and it suggests a minimum distance (~25 Å) required for the concrete interactions between peptide/H-2 proteins occur.

SUMÁRIO

	Dedicatória	v
	Agradecimentos	vi
	Resumo.....	vii
	Abstract	viii
	Índice de Figuras	xi
	Lista de Tabelas	xiii
	Lista de Siglas e Abreviaturas	xiv
1	INTRODUÇÃO	1
	1.1 Considerações Gerais Quanto ao Modelo Biológico	1
	1.2 O Camundongo como Modelo Experimental na Infecção por <i>Leishmania spp</i>	6
	1.3 Cisteíno-proteinase como Fator de Virulência em <i>Leishmania spp</i>	7
	1.4 A Estrutura e Formação de Complexo Supramoleculares entre MHC e Peptídeos	10
	1.4.1 A Estrutura do MHC de Classe I.....	10
	1.4.2 Resíduos Conservados na Interação entre Peptídeos e MHC de Classe I.....	13
	1.4.3 Os Sulcos de Ligação da Fenda do MHC de Classe I.....	14
	1.5 A Dinâmica Molecular Aplicada ao Estudo das Interações Proteína-Ligante	16
	1.6 A Metadinâmica e o Uso de Variáveis Coletivas.....	22
2	OBJETIVOS	27
	2.1 Objetivo Geral.....	27
	2.2 Objetivos Específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
	3.1 Seleção de Epítomos da <i>Cyspep</i>	28
	3.2 Escolha dos Complexos H-2/peptídeos para Validação da Metadinâmica.....	29
	3.3 Parâmetros das Simulações da Dinâmica Molecular	32
	3.4 Avaliação dos Resultados das Simulações	34

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Determinação das Variáveis Coletivas	37
4.2	Validação dos Ensaios de Metadinâmica	40
4.2.1	Construção da SEL para os Complexos do Conjunto de Validação	40
4.2.2	Cálculo da Energia Livre de Dissociação dos Peptídeos e as Proteínas H-2 de Classe I	54
	4.3 Aplicação da Metadinâmica para os Peptídeos Preditos	
	Derivados da Cyssep	57
4.3.1	Construção da SEL para os Complexos H-2/Peptídeos Derivados da <i>Cyssep</i>	57
4.3.2	Cálculo da Energia Livre de Dissociação entre os Peptídeos Derivados da <i>Cyssep</i> e a Proteína H-2 de Classe I	70
4.4	Interações Moleculares nos Complexos Peptídeos Preditos da <i>Cyssep</i> e as Proteínas H-2 de Classe I	74
4.4.1	Ligações de Hidrogênio entre os Peptídeos Derivados da <i>Cyssep</i> e as Proteínas H-2 de Classe I	75
4.4.2	Energia de Interação Intermolecular entre os Peptídeos Derivados da <i>Cyssep</i> e as Proteínas H-2 de Classe I	80
4.4.3	Distância para a Interação entre Peptídeos e as Proteínas H-2 de Classe I	83
5	CONCLUSÕES	88
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7	APÊNDICES	97
	APÊNDICE A - INTERAÇÕES ENVOLVENDO OS LIGANTES E AS PROTEÍNAS H-2 DE CLASSE I PARA OS COMPLEXOS CRISTALOGRAFICOS	97
	APÊNDICE B - ARQUIVOS DE CONFIGURAÇÃO PARA EXECUÇÃO DAS SIMULAÇÕES DA METADINÂMICA	98
	APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	3
Figura 2: Estrutura da proteína do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC de classe I).....	12
Figura 3: Fenda do MHC de classe I em complexo com o peptídeo associado. Detalhe da fenda do MHC de classe I delimitada pelos domínios α 1-hélice e α 2-hélice.....	15
Figura 4: Representação do modelo de esferas e molas da Mecânica Molecular...18	
Figura 5: Representação dos termos utilizados na função de energia para a interação entre proteínas.....	19
Figura 6: Atuação da MetaD sobre um potencial de energia unidimensional.....	25
Figura 7: Imagem dos complexos cristalográficos 1ld9, 1vgk, 1zt1 e 1yn6, usados como conjunto de validação para a técnica da MetaD.	31
Figura 8: Variáveis coletivas VC1 e VC2.....	39
Figura 9: Representação da localização do mínimo global das SELs dos complexos de validação.....	43
Figura 10: Representação bidimensional das SELs para as estruturas cristalográficas.....	45
Figura 11: Representação Tridimensional das SELs para as estruturas cristalográficas.....	46
Figura 12: Evolução temporal da SASA dos peptídeos nos complexos cristalográficos.....	50
Figura 13: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e a fenda da proteína H-2 de classe I para os complexos cristalográficos.....	52
Figura 14: Evolução temporal da energia de ligação entre os peptídeos e a fenda da proteína H-2 de classe I para os complexos cristalográficos.....	53
Figura 15 - Projeção unidimensional das SELs dos complexos H-2/peptídeos.....	55
Figura 16: Modelo tridimensional dos heterodímeros formados pelos peptídeos da cyspep e a estrutura H-2 D ^b	59

Figura 17: Modelo tridimensional dos heterodímeros formados pelos peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 L ^d	60
Figura 18: Representação bidimensional da SEL para os complexos formados pelos peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 D ^b	62
Figura 19: Representação bidimensional da SEL para os complexos formados pelos peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 L ^d	63
Figura 20: Evolução temporal da SASA dos peptídeos da <i>cyssep</i> nos heterodímeros formados com a estrutura H-2 D ^b	64
Figura 21: Evolução temporal da SASA dos peptídeos da <i>cyssep</i> nos heterodímeros formados com a estrutura H-2 L ^d	65
Figura 22: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 D ^b	66
Figura 23: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 L ^d	67
Figura 24: Evolução temporal da energia de ligação, entre os peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 D ^b	68
Figura 25: Evolução temporal da energia de ligação, entre os peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 L ^d	69
Figura 26: Projeção unidimensional das SEL dos heterodímeros formados pelos peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 D ^b	71
Figura 27: Projeção unidimensional das SEL dos heterodímeros formados pelos peptídeos da <i>cyssep</i> e a estrutura H-2 L ^d	72
Figura 28: Proporção da energia de interação intermolecular entre os resíduos dos complexos para os haplótipos D ^b e L ^d	82
Figura 29: Energia de interação intermolecular pela distância entre os centros de massa da proteína e dos peptídeos da <i>cyssep</i>	85
Figura 30: Energia de interação intermolecular pela distância entre os centros de massa da proteína e do peptídeo do conjunto de validação.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de aminoácidos dos peptídeos dos complexos avaliados...	30
Tabela 2 - Pares de variáveis coletivas testadas para as simulações por MetaD....	38
Tabela 3: Tempos de corte para simulação da MetaD.....	42
Tabela 4: RMSD entre os resíduos dos peptídeos no mínimo de energia na SEL e a posição cristalográfica.....	48
Tabela 5: variação sasa, energia de interação intermolecular e N° de ligações de hidrogênio nos ensaios da DM clássica.....	51
Tabela 6: Energia livre de dissociação para os complexos do conjunto de teste.....	56
Tabela 7: Comparação das energias livres de dissociação para os complexos H-2 peptídeos derivados da <i>cyspep</i>	73
Tabela 8: Percentuais de tempo das ligações de hidrogênio ocorridas entre os peptídeos e as proteínas H-2 D ^b	78
Tabela 9: Percentuais de tempo das ligações de hidrogênio ocorridas entre os peptídeos e as proteínas H-2 L ^d	79
Tabela 10: Regiões de interação intermolecular entre para os peptídeos as proteínas H-2 de Classe I.....	87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	angstrom
ABF	<i>Adaptive biasing force</i> (viés de força adaptativo)
APC	<i>Antigen presenting cells</i> (células apresentadoras de antígeno)
BALB/c	Linhagem de camundongos empregados como modelo <i>in vivo</i>
C57BL/6	Linhagem de camundongos empregados como modelo <i>in vivo</i>
CA	Tipo de clã das cisteíno-proteínases
CD4	<i>Cluster of differentiatton antigen</i> (grupo de diferenciação antígeno 4)
CD8	<i>Cluster of differentiatton antigen</i> (grupo de diferenciação antígeno 8)
CM	Centro de massa
CM1	Centro de massa do peptídeo
CM2	Centro de massa da proteína
CP	Cisteíno-proteínase
CPA	Cisteíno-proteínase tipo A
CPB	Cisteíno-proteínase tipo B
CPC	Cisteíno-proteínase tipo C
CPC	Condições periódicas de contorno
C_v	Coefficiente de variação
Cyspep	Região da extensão COOH-terminal da CPB
Δcpa	Parasitos mutantes deficientes nestes genes para CPA
Δcpb	Parasitos mutantes deficientes nestes genes para CPB
Δcpc	Parasitos mutantes deficientes nestes genes para CPC
D^b	Haplótipo D^b
DM	Dinâmica Molecular
Gp63	Glicoproteína de 63 kDa
H-2 D^b	Complexo Histocompatibilidade Haplótipo D^b
H-2 K^d	Complexo de histocompatibilidade para camundongos - haplótipo K^d
H-2 K^k	Complexo de histocompatibilidade para camundongos - haplótipo K^k
H-2 L^d	Complexo de histocompatibilidade para camundongos - haplótipo L^d
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucotário humano)
IFN- γ	Interferon gama
IL-4	Interleucina-4
k_a	Constante de associação
kcal/mol	Quilocaloria por mol

kDa	Quilodálton
L ^d	Haplótipo L ^d
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MetaD	Metadinâmica
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
MM	Mecânica molecular
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (ressonância magnética nuclear)
NPT	Ensemble de simulação isotérmico-isobárico
ns	nanossegundo
PDB	<i>Protein data bank</i>
PISA	<i>Proteins, interfaces, structures and assemblies</i>
PME	<i>Particle mesh Ewald</i> (malha de partícula de Ewald)
PSF	<i>Protein structure file</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> (desvio médio quadrado)
SASA	<i>Solvent accessible surface area</i> (área acessível exposta ao solvente)
SEL	Superfície de energia livre
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> (ressonância plasmônica de superfície)
Th	Linfócito T auxiliar
Th1	CD4+ <i>helper T cell type</i> (linfócito T CD4+ auxiliar do tipo 1)
Th2	CD4+ <i>helper T cell type</i> (linfócito T CD4+ auxiliar do tipo 2)
Tc	Linfócito T citotóxico
VC	Variável coletiva
VC1	Variável coletiva 1
VC2	Variável coletiva 2

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais Quanto ao Modelo Biológico

A leishmaniose expõe a risco cerca de 350 milhões de pessoas no mundo. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Há registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (1). É uma doença endêmica com vasta distribuição geográfica, com alto coeficiente de detecção e capaz de produzir severas deformidades (1). As manifestações clínicas da leishmaniose são agrupadas em duas categorias: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). De uma maneira geral, estas manifestações clínicas estão associadas às espécies do parasito e ao estado imunológico do hospedeiro vertebrado.

A atual posição taxonômica dos agentes etiológicos das leishmanioses considera tais parasitos como sendo do sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Esta família reúne oito gêneros, entre os quais se encontra o gênero *Leishmania* que, por sua vez, reúne as seções Paraleishmania e Euleishmania (Figura 1). A seção Euleishmania compreende a os subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Somente as espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são descritas como causadoras de doença no homem. Já as infecções causadas por parasitos do subgênero *Sauroleishmania* tem relatos de ocorrência em répteis (2).

Os parasitos do subgênero *Leishmania* têm um comportamento suprapilárico, pois se desenvolvem na porção do tubo digestivo anterior ao piloro do hospedeiro invertebrado, principalmente nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio. Os parasitos do subgênero *Viannia* têm comportamento peripilárico, devido colonização destes parasitos na parte posterior do tubo digestivo e no intestino médio abdominal do hospedeiro. Já os parasitos do subgênero *Sauroleishmania* têm comportamento hipopilárico, estando seu desenvolvimento restrito ao intestino posterior dos hospedeiros invertebrados (2).

A distribuição geográfica desses subgêneros da *Leishmania* ocorre de forma distinta: o subgênero *Leishmania* é encontrado nas Américas e no Velho Mundo; o subgênero *Viannia* é encontrado nas Américas; e o subgênero *Sauroleishmania* tem casos relatados apenas no Velho Mundo (3, 4)

No Brasil, entre os parasitos do subgênero *Leishmania* destaca-se a *Leishmania (L.) amazonensis* com vasta distribuição geográfica tendo maior ocorrência nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. A sua presença mais frequente se dá na região amazônica, sendo uma doença essencialmente rural, onde muitos dos casos são registrados quando os possíveis hospedeiros vertebrados adentram as áreas de floresta (5). No entanto, a descoberta de novos casos desta doença mostra que esta espécie de parasito vem aumentando a sua distribuição em todo o país (6).

Além da organização por subgêneros, o gênero *Leishmania* também é usualmente dividido em complexos, englobando espécies utilizando critérios extrínsecos para a sua classificação, tais como comportamento do parasito em cultura e em *hamster*. A taxonomia apresentada na Figura 1 leva em conta não somente estes aspectos extrínsecos, mas também outros fatores, obtidos da análise de marcadores moleculares associadas aos conceitos utilizados na descrição de cada uma das espécies (7). Mesmo assim, algumas descrições de espécies ainda mantêm como base apenas a utilização de critérios extrínsecos, como por exemplo, a localização geográfica de cada uma delas: *L. guyanensis* e *L. peruviana*.

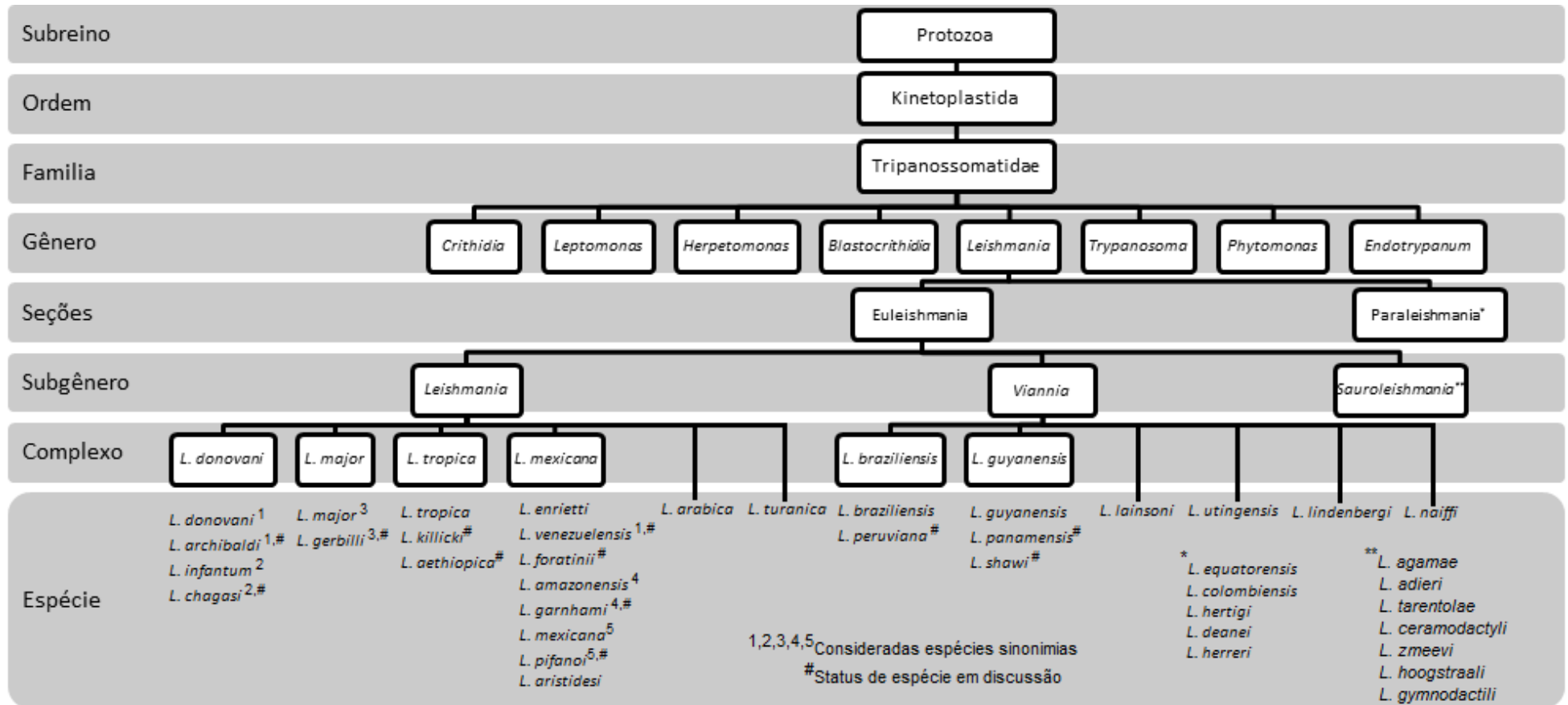


Figura 1: Taxonomia do gênero *Leishmania*. A figura representa a posição taxonômica dos parasitos do gênero *Leishmania*, considerando a inclusão das seções e subgêneros, e a divisão dos subgêneros em diferentes complexos e espécies. Adaptada a partir do texto de Cupolillo (7).

O Brasil concentra cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral na América Latina (8). A ausência de fármacos apropriados para seu tratamento, a expansão geográfica da doença e a tendência de urbanização têm sido apresentados como fatores preocupantes para o controle desta enfermidade. Por exemplo, esta tendência de urbanização da doença já foi observada na periferia de grandes cidades do Nordeste e do Centro-Oeste (9), o que realmente é um forte motivo de preocupação para o seu controle.

A espécie do parasito está associada às formas clínicas LT e LV, e à resposta à terapia. Embora haja tratamentos para as diversas manifestações clínicas da doença, tais tratamentos ainda apresentam uma elevada toxicidade e eficácia questionável (10), sendo de extrema importância a identificação da espécie do parasito para que se possa direcionar o tratamento (11).

A *Leishmania* é transmitida durante o repasto sanguíneo do inseto vetor flebotomíneo, quando as formas promastigotas infectantes do parasito são introduzidas na pele do hospedeiro vertebrado, entrando em contato com as células do seu sistema imune como os linfócitos T e B, macrófagos residentes, células de Langerhans, mastócitos, entre outras (12).

A ativação do sistema imune no hospedeiro vertebrado se dá quando acontece a infecção pelo parasito e o organismo utiliza-se deste na tentativa de controlar a infecção. No entanto a *Leishmania* estabelecida dentro dos macrófagos apresenta mecanismos de evasão contra as ações do sistema imune do hospedeiro, de tal forma que a infecção avança com a invasão de outras células do organismo. Portanto, os fatores de virulência para a infecção por *Leishmania* são aqueles que permitem a estes parasitos invadir e sobreviver no hospedeiro vertebrado.

Entre os componentes que facilitam, aumentam ou incentivam estes fatores de virulência estão os glicoinositolfosfolipídeos, lipofosfoglicanos, proteofosfoglicanos e a proteína de membrana de cinetoplastídeos de 11 kDa. Existem evidências de que esses componentes modulam a interação entre a *Leishmania* e as células do hospedeiro vertebrado, muito embora o seu impacto nas manifestações clínicas observadas, não esteja ainda completamente definido (13).

Além desses fatores, as enzimas da classe cisteíno-proteinase (CP) também são descritas como componentes do parasito que estão relacionadas ao aumento da infecção e à sua sobrevivência nas células do hospedeiro vertebrado(14). Esta proteinase é objeto de estudo neste trabalho de tese onde é explorado o potencial de epítomos oriundos desta proteinase de formar complexos com as proteínas do sistema principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês (*major histocompatibility complex class*) de classe I de camundongos (H-2).

Ao longo do presente estudo se propõe contribuir na ampliação do conhecimento a respeito da interação em escala molecular entre peptídeos derivados da extensão COOH-terminal da cisteíno-proteinase B, denominada *cyspep*, da *L. (L.) amazonensis*, com as proteínas H-2 de classe I. Isto se faz necessário, pois o modo de ligação entre os peptídeos oriundos da *cyspep* e as proteínas H-2 de classe I ainda carece de informações, sendo esta etapa um importante passo na definição das condições para ligação de epítomos com atividade biológica na resposta imune desencadeada pela *L. (L.) amazonensis* durante a infecção experimental.

1.2 O Camundongo como Modelo Experimental na Infecção por *Leishmania spp*

O uso de modelos experimentais de infecção em animais de laboratório faz-se necessário para que se possa ter uma compreensão dos aspectos imunológicos da infecção por parasitos da *Leishmania* (15). Desta forma, as manifestações clínicas da leishmaniose podem ser parcialmente reproduzidas em linhagens isogênicas de camundongos. Nestes modelos se investiga a expressão de citocinas que definem os fenótipos de linfócitos T CD4+ (Th – linfócito T auxiliar) e CD8+ (Tc – linfócito T citotóxico) do tipo 1 (Th/Tc1) e do tipo 2, (Th/Tc2). Cada um desses tipos de linfócitos T produz diferentes tipos de citocinas que ativam funções do sistema imune do hospedeiro vertebrado e a eficácia da resposta imune se dá através do equilíbrio entre a ativação das células Th1/Tc1 e Th2/Tc2. A alteração do equilíbrio da resposta imune Tipo 1/Tipo 2 pode levar a uma alteração no perfil da infecção.

A resistência à infecção está associada à resposta imune conduzida através de linfócitos que expressam citocinas tipo 1, enquanto que a suscetibilidade é associada à resposta imune conduzida através de linfócitos que expressam citocinas tipo 2 (16), o que constitui o paradigma da resposta imune. No modelo murino, a dicotomia entre as respostas do tipo 1 e do tipo 2 está associada à produção das citocinas IFN- γ e IL-4, respectivamente. Em cada um desses casos, a produção dessas citocinas foi observada em camundongos resistentes ou suscetíveis à doença (17).

Assim, dependendo do perfil específico de citocinas secretadas pelos linfócitos T, há diferenças no perfil de resistência ou suscetibilidade à infecção por *Leishmania*. De um modo geral, no modelo de infecção murina por *Leishmania (Leishmania) major*, a linhagem C57BL/6 mostra-se uniformemente resistente, por ter uma resposta do tipo 1 e impedir o crescimento do parasito, enquanto a linhagem BALB/c mostra-se suscetível por ter uma resposta do tipo 2, o que resulta em lesões não cicatrizantes e em um agravamento da infecção. Por outro lado, no modelo de infecção murina por *L. (L.) amazonensis* o conceito de suscetibilidade/resistência não está bem definido, uma vez que pode ocorrer uma resposta do tipo 2 predominante, uma ausência ou supressão da resposta do tipo 1 ou, ainda, uma resposta mista (18, 19).

Nas infecções murinas por espécies do complexo *L. (L.) mexicana*, como a *L. (L.) amazonensis*, ainda não há uma definição tão clara quanto ao paradigma da resposta imune do tipo 1 e do tipo 2, aplicados ao conceito de resistência e suscetibilidade predominantes (20). Não há comprovação de que a suscetibilidade também esteja associada à ausência de uma resposta do tipo 1 (21, 22) ou mesmo à uma resposta com características do tipo 1 e do tipo 2, conjuntamente (18, 19).

Os antígenos do parasito envolvidos na indução dos perfis de resposta imune do tipo 1 ou 2 ainda não foram suficientemente estudados. Neste sentido, as cisteíno-proteínases (CP) de *Leishmania* spp têm um importante papel nesta modulação da resposta imune durante as infecções experimentais por *Leishmania*.

1.3 Cisteíno-proteínase como Fator de Virulência em *Leishmania* spp

As CPs das *Leishmania* spp são relacionadas a importantes ações na modulação da resposta imune nas infecções experimentais. Estas enzimas atuam na clivagem das ligações peptídicas, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres. De acordo com a classificação da natureza química do sítio catalítico das proteases, a CP tem o resíduo cisteína envolvido na catálise enzimática no seu sítio ativo (23). O foco dos trabalhos realizados sobre a atividade das CPs de *Leishmania* spp está relacionado às enzimas designadas por CPA, CPB e CPC, todas da família da papaína e pertencentes ao clã CA (13). Neste parasito, a CPB possui uma característica diferenciada por apresentar uma extensão com 100 aminoácidos na sua região COOH-terminal (24, 25).

Há evidências que a CPB seja utilizada pelo parasito para escapar da ação do sistema imune do hospedeiro vertebrado, sendo utilizada para subverter diversas de suas funções, de modo a favorecer um tipo de resposta mais vantajosa à sua sobrevivência (26). Durante a infecção experimental de camundongos BALB/C, observou-se a incapacidade de parasitos *L. (L.) mexicana* Δ *cpb* (parasitos mutantes deficientes nestes genes para CPB) de expressarem a citocina IL-4. A supressão da produção da citocina IL-4 permitiu assim a estruturação de uma resposta imune do tipo 1, mais favorável ao controle da doença. Deste modo a virulência está associada com a habilidade da CPB de induzir a produção do IL-4 e com isso uma resposta do tipo 2, mais favorável à expansão da infecção (14).

Evidências da atuação da CPB na regulação do sistema imune do hospedeiro de parasitos *L. (L.) mexicana* foram obtidas em ensaios de infecção em camundongo BALB/C, utilizando cepas de parasitos geneticamente modificados, tendo os genes das enzimas CPA, CPB e CPC suprimidos (cepas Δcpa , Δcpb e Δcpc). Os resultados mostram pouca redução da capacidade de infecção dos parasitos Δcpa e Δcpc . No entanto, os parasitos Δcpb tiveram essa capacidade fortemente reduzida, promovendo menos lesões nos camundongos, quando comparados com os parasitos da cepa selvagem (27, 28). Estudos posteriores analisaram os efeitos da reinserção dos genes codificadores para CPB na cepa Δcpb e mostraram que a reinserção de uma cópia única de gene *cpb* nesses parasitos não restaurou sua virulência, somente a reinserção de múltiplos genes CPB nesses mutantes conseguiu efetivamente restaurar a virulência, sugerindo funções complementares entre os genes (29).

Além do efeito na regulação da resposta imune do tipo 1 e do tipo 2, as CPs também exercem um papel importante na apresentação de antígenos pelos MHC de classe I e classe II, que são proteínas do hospedeiro relacionadas com a resposta imune adaptativa contra infecções em mamíferos. Durante a infecção por *Leishmania* spp, há a expressão de proteínas do MHC de classe I e classe II, levando à ativação dos linfócitos T. Durante a infecção, as *Leishmania* spp são capazes de clivar as proteínas do MHC de classe II, de tal forma a reduzir a sua capacidade de estimular linfócitos T. Há também evidências de que as CPs de *L. (L.) amazonensis* sejam responsáveis pela inibição da apresentação de antígeno pela clivagem do MHC de classe II no vacúolo parasitóforo de murinos (30). Isto sugere um potencial mecanismo imunorregulatório, onde a resposta imune adaptativa ao parasito seja conduzida pelo MHC de classe I.

A extensão COOH-terminal da CPB também já foi reportada como altamente imunogênica e como potencial fator de influência na evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* (31), *L. (L.) infantum* (32) e *L. (L.) donovani* (33). Também foi observado que durante o processamento da CPB de *Leishmania* sp., a sua extensão COOH-terminal é hidrolisada (34) e secretada para o ambiente extracelular (35). Esse polipeptídeo já foi observado no citoplasma de células do hospedeiro (36), ficando o fragmento disponível para a interação com o sistema imune, em especial para a apresentação pelas proteínas de MHC.

Assim, através da utilização de abordagens de mapeamento de epítomos por simulação computacional e de posteriores ensaios biológicos, obteve-se a indicação de que peptídeos derivados da região COOH-terminal da CPB apresentam capacidade de induzir a proliferação celular e de expressar citocinas relacionadas às respostas do tipo 1 e do tipo 2 (37). Além disso, resultados de *docking* molecular indicaram que o modo de interação entre as proteínas do MHC e os epítomos pode estar relacionado com os efeitos imunomoduladores sobre as citocinas, apontando para padrões de interação peptídeos/MHC de classe I associados a padrões de indução da expressão de citocinas (38).

Em um trabalho recente (39), sete sequências de aminoácidos derivadas da extensão COOH-terminal da CPB *L. (L.) amazonensis* foram identificadas computacionalmente como potenciais peptídeos capazes de interagir com o MHC de classe I, no modelo experimental murino. Também foram confirmados as suas habilidades para formarem complexos com o domínio $\alpha 1/\alpha 2$ da proteína do MHC de classe I, para os haplótipos L^d e D^b, no modelo murino. Para medir a afinidade dessas ligações foram feitos ensaios de ressonância plasmônica de superfície, de modo que fosse possível estabelecer as taxas de associação e dissociação dos complexos, e conseqüentemente calcular o valor estimado da energia livre de ligação. Os resultados mostrados neste trabalho evidenciam que aqueles peptídeos derivados da extensão COOH-terminal da CPB estabelecem uma interação estável com as proteínas do MHC de classe I em diferentes haplótipos (L^d e D^b). No entanto, as interações em nível molecular entre os peptídeos e as proteínas do MHC de classe I, no modelo murino, ainda não são completamente conhecidas. Deste modo, metodologias computacionais, tal como as simulações por dinâmica molecular, podem ser uma abordagem útil para o estudo destas interações.

Assim, em nosso trabalho propomos estudar a mecanística molecular que se estabelece na interação entre as proteínas do MHC de classe I, no modelo murino, e epítomos preditos a partir da região COOH-terminal da CPB da *Leishamina*.

1.4 A Estrutura e Formação de Complexos Supramoleculares entre MHC e Peptídeos

O MHC é uma extensa região do genoma constituída por genes que codificam para proteínas que são expressas na superfície das células. Ele é responsável por apresentar para os linfócitos T tanto antígenos próprios quanto antígenos externos e, portanto, tem atuação em numerosas funções imunológicas. Entre elas estão a seleção das células T que atuarão durante a resposta imune, a indução de tolerância aos antígenos próprios, a produção de anticorpos, a imunidade mediada pelas células T auxiliares, as respostas inflamatórias e diversos outros fatores ligados ao sistema imune. O complexo do MHC é dividido em classes I, II e III (40) que estão presentes em todos os vertebrados, sendo que em humano recebem a designação de antígenos leucocitários humanos (*human leukocyte antigens*; HLA) e para camundongos H-2. As proteínas do MHC se ligam a peptídeos produzidos no interior da célula e os apresentam na sua superfície. Deste modo, o sistema imune é alertado da presença de antígenos externos através do reconhecimento pelo receptor das células T de um complexo formado pelo MHC e um peptídeo derivado de uma proteína externa (41).

O MHC de classe I aparece na superfície da maior parte das células e apresenta para o sistema imune peptídeos derivados de proteínas que foram degradadas no citosol. Portanto, é a apresentação desses complexos MHC/peptídeos na superfície das células que alerta ao organismo da presença de algum patógeno intracelular. Estes complexos interagem com as células T citotóxicas, direcionando a resposta imune para a célula apresentadora de antígeno (APC).

O MHC de classe II aparece na superfície de células especializadas do sistema imune (linfócitos B e macrófagos apresentadores de antígenos). Estes complexos interagem com as células T auxiliares, mediando a ativação de macrófagos e a proliferação de células que sintetizam anticorpos que circulam no sangue (41).

1.4.1 A Estrutura do MHC de Classe I

A estrutura do MHC de classe I é composta de duas cadeias polipeptídicas (Figura 2). A primeira delas possui uma estrutura de domínio modular formado pelos

domínios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$, tendo uma pequena região transmembranar. A segunda cadeia é a $\beta 2$ -microglobulina, que é uma estrutura não polimórfica que se posiciona ao lado do domínio $\alpha 3$, não possuindo região transmembranar.

Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ têm uma dobradura comum e interagem entre si para formar uma estrutura combinada simétrica. Os peptídeos se ligam à fenda do MHC de classe I criada a partir de duas longas α -hélices curvas. Há um grande polimorfismo nas regiões da vizinhança da fenda de forma a proporcionar uma variação na especificidade dos peptídeos capazes de se ligarem a ela. Já os domínios $\alpha 3$ e $\beta 2$ -microglobulina não interagem com os peptídeos que estão ligados à fenda (Figura 2).

MHC de classe I é capaz de se ligar a peptídeos de tamanho limitado, variando entre 8 e 11 aminoácidos, sendo mais comuns aqueles que possuem 8 ou 9 aminoácidos em sua sequência. Existem dois fatores que impõem estes limites ao MHC de classe I. O primeiro deles é o fechamento da fenda em cada uma das suas extremidades. O segundo é a existência de uma ponte salina ligando o grupo carboxila da região COOH-terminal do peptídeo ao grupo amina do resíduo Lys146 da proteína. A fenda pode acomodar peptídeos com até 9 aminoácidos numa conformação quase estendida. Em peptídeos com uma quantidade maior de aminoácidos, a ligação do peptídeo com a proteína pode acarretar em uma deformação da sua acomodação à fenda, projetando alguns de seus resíduos em direção ao exterior dos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da proteína (41).

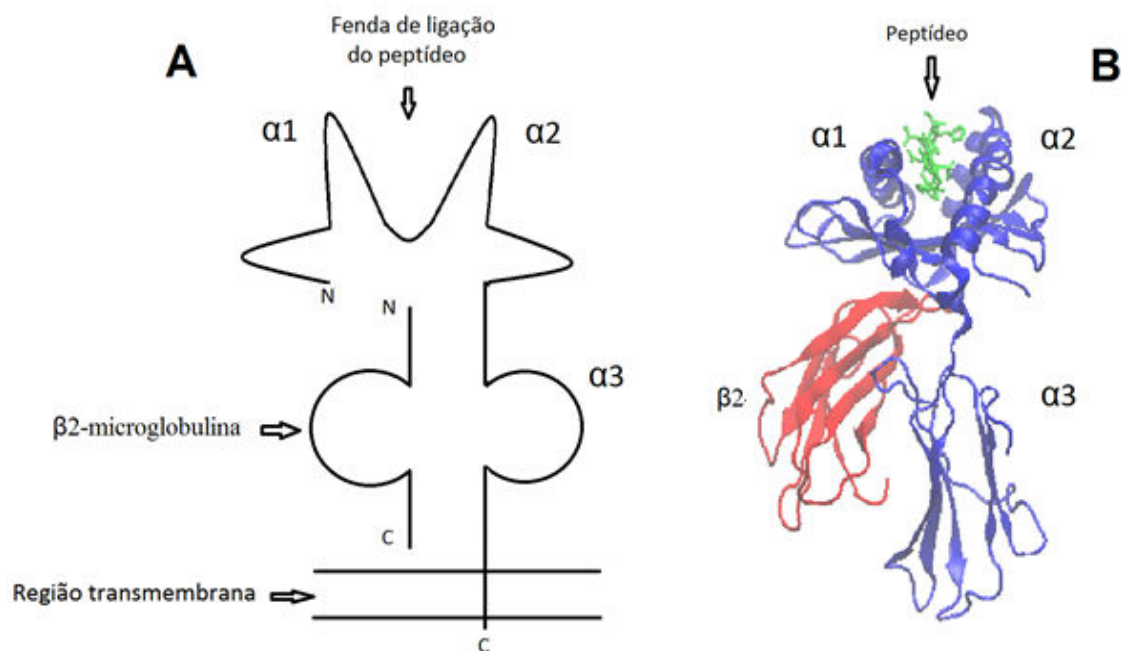


Figura 2: Estrutura da proteína do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC de classe I). A figura representa a organização estrutural do heterodímero MHC de classe I em esquema (A) e em sua organização tridimensional (B), utilizando como modelo a estrutura do PDB 1vgk. Em (A) destaca-se a cadeia alfa inserida na região transmembrana pela região COOH-terminal, os respectivos domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e a cadeia beta, ressaltando o domínio $\beta 2$ microglobulina. A fenda de ligação do peptídeo é destacada entre os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Em (B) as cadeias alfa (azul) e beta (vermelho) do heterodímero estão representadas em *new cartoon* e o peptídeo (verde) ligado à fenda, em *licorice*.

1.4.2 Resíduos Conservados na Interação entre Peptídeos e MHC de Classe I

Nos eventos necessários à apresentação de antígenos aos linfócitos T é crucial que os peptídeos se liguem fortemente ao MHC, e é possível que milhares de peptídeos com diferentes sequências de aminoácidos se liguem à fenda da proteína com afinidades similares. Embora estas ligações tenham o caráter de não se tornarem extremamente específicas, sabemos que cada haplótipo de MHC liga peptídeos que possuem preferencialmente alguns resíduos de aminoácido em certas posições de sua composição (42). No entanto, os outros resíduos de aminoácidos dos peptídeos, localizados em posições diferentes a estas, podem sofrer grande variação e auxiliam na fixação do peptídeo ao MHC. Portanto, para estas regiões polimórficas dos peptídeos, a ligação estabelecida com a fenda do MHC se dá por meio de sua cadeia principal. Já os resíduos não polimórficos são reconhecidos como sendo os resíduos âncoras da interação entre o peptídeo e o MHC (43).

É fato que o domínio $\alpha 1/\alpha 2$ do MHC seja polimórfico (44) e que resíduos de ambas as regiões participem da ligação com os peptídeos. A ligação das regiões COOH e NH₂ terminais dos peptídeos se dá por intermédio de resíduos conservados da fenda do MHC, tanto para humanos (HLA) como para camundongos (H-2).

Os resíduos conservados do domínio $\alpha 1/\alpha 2$ Tyr7, Tyr59 e Tyr171 se ligam ao grupo amina da região NH₂-terminal do peptídeo e também, outro resíduo conservado (Tyr159) interage com o oxigênio do grupo carbonila desta mesma região do peptídeo (43).

Por outro lado, os resíduos conservados da proteína do MHC Tyr84, Thr143 e Lys146 se ligam à região COOH-terminal do peptídeo, formando ligações de hidrogênio com o grupo carboxila desta região. Já o resíduo conservado Trp147 forma ligações de hidrogênio com o oxigênio do grupo carboxila do penúltimo resíduo do peptídeo (43).

1.4.3 Os Sulcos de Ligação da Fenda do MHC de Classe I

Muitas das ligações entre o peptídeo e o MHC são estabelecidas por meio da cadeia principal do peptídeo. Cada forma alélica do MHC preferencialmente se liga a certos resíduos do peptídeo em sulcos diferentes da fenda. Existem seis sulcos classificados na fenda do MHC de classe I: A, B, C, D, E e F (Figura 3), sendo que nem todos os sulcos participam da ligação dos peptídeos, sob todas as formas alélicas dos complexos.

A região NH₂-terminal do peptídeo se liga ao sulco A da fenda, sendo geralmente muito flexível em relação à sua cadeia lateral, que fica exposta ao solvente. Já a região COOH-terminal se liga ao sulco F da fenda, e é usualmente mais restritiva quanto à cadeia lateral do resíduo do peptídeo que pode ser apresentado nesta região. A cadeia lateral da região COOH-terminal é mais aprofundada na fenda, diferentemente da região NH₂-terminal que tem sua cadeia lateral mais exposta ao solvente. Deste modo, a cadeia lateral da região COOH-terminal do peptídeo apresenta ligações mais fortes com a proteína do MHC, sendo este resíduo considerado como âncora da ligação (43). A cadeia lateral do resíduo da região COOH-terminal do peptídeo é considerada a âncora primária para a ligação com a proteína do MHC. Já as âncoras secundárias podem ocorrer nas posições P2, P3 ou P5 do peptídeo (45).

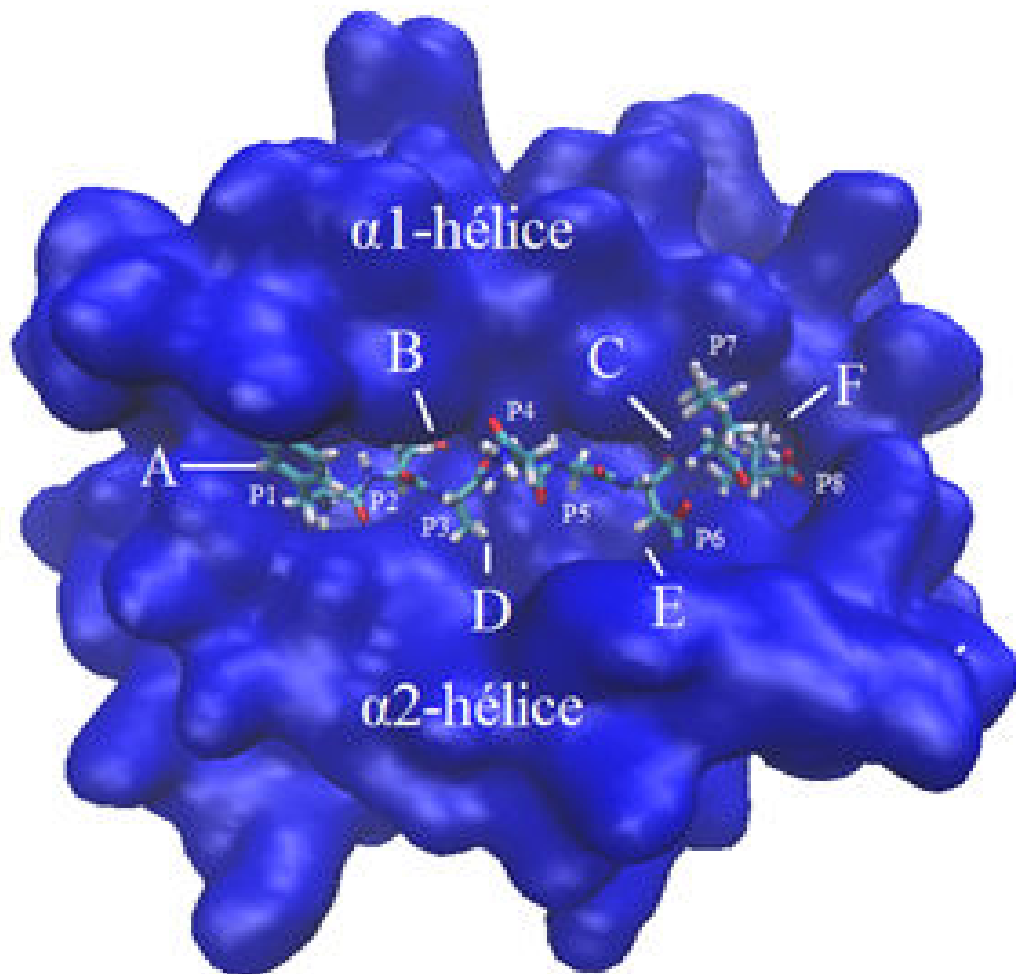


Figura 3: Fenda do MHC de classe I em complexo com o peptídeo associado. Detalhe da fenda do MHC de classe I delimitada pelos domínios $\alpha 1$ -hélice e $\alpha 2$ -hélice. Na figura, é possível identificar os sulcos (A-F), onde há um peptídeo (FEANGNLI) de 8 resíduos de aminoácidos (P1-P8) associados aos resíduos de aminoácidos que formam os sulcos A a F (código PDB 1zt1) .

1.5 A Dinâmica Molecular Aplicada ao Estudo das Interações Proteína-Ligante

Metodologias computacionais diversas vêm sendo aplicadas para simular os eventos de ligação dos peptídeos que ocorrem na fenda do MHC (46-49) e dentro destas propostas são insuficientes os estudos de ensaios de simulação por dinâmica molecular (DM). Esta abordagem pode ser útil na definição das interações que regem a ligação dos peptídeos derivados da extensão COOH-terminal da *Leishmania* às proteínas H-2 de classe I (39).

A base dos ensaios de DM é a simulação do movimento de um sistema de partículas, onde se calcula a dinâmica do sistema mediante a resolução das equações clássicas do movimento. As forças de interação entre as partículas do sistema, que determinam o seu movimento, derivam do conhecimento do potencial de energia de interação que ocorre entre elas (50).

Nas simulações por DM é possível estabelecermos avaliações individuais do movimento de partículas em função do tempo, diferentemente de outros métodos que não contemplam a evolução temporal das partículas, permitindo responder questões específicas sobre as propriedades dinâmicas de um sistema (50).

As simulações por DM estão baseadas em conceito da Mecânica Molecular (MM), onde há um tratamento estatístico obtido a partir das posições de um sistema de partículas, em que se utilizam funções de energia potencial simples para criar um modelo do comportamento do sistema como um todo. Nos modelos da MM não há informação da contribuição eletrônica dos átomos, isto é, estes são considerados como esferas de massa M conectadas entre si por um sistema de molas, conduzidos por meio de osciladores harmônicos (Figura 4). Essa aproximação é conhecida como aproximação de Bohr-Oppenheimer, que leva em conta o fato de que o movimento do núcleo dos átomos é muito mais lento do que o movimento dos seus elétrons (51). Deste modo, é possível distinguir as informações nucleares e eletrônicas para resolvê-las separadamente. Além disso, as forças internas que agem sobre o sistema são descritas por funções matemáticas simples, obtidas como função das posições espaciais de cada um dos átomos. Utilizando esses modelos é possível simular a dinâmica do movimento do sistema como um todo.

A energia potencial do sistema é calculada através dessas funções matemáticas, e é denominado campo de força (52), dependentes das posições geométricas dos átomos. A energia total do sistema é calculada pela soma da energia potencial e a energia cinética das partículas.

As funções de energia utilizadas nas simulações da DM são funções das coordenadas atômicas e velocidades das partículas e a sua superfície de energia potencial determina os estados de estabilidade relativa do sistema. As forças que agem sobre os átomos são obtidas através da derivada segunda da função potencial, em relação às posições dos átomos, e são utilizadas para calcular o comportamento dinâmico do sistema. Este comportamento dinâmico é calculado através da solução das equações de Newton para o movimento de partículas em função do tempo (50).

As funções de energia utilizadas são geralmente compostas de termos ligados e não ligados. Os primeiros representam o comprimento da ligação entre dois átomos, os ângulos estabelecidos nas ligações de três átomos e os ângulos diedros. No caso dos ângulos diedros formados pela interação entre quatro átomos, podem-se definir dois tipos de ângulos diedros. Os ângulos diedros próprios que definem geometrias com transição, ou periódicas; e os ângulos diedros impróprios utilizados para definir a quiralidade em tetraedros ou planaridade em anéis. As interações não ligadas são compostas de termos computados por meio do potencial de Lennard-Jones (53)) (forças de van der Waals) e da contribuição eletrostática (potencial de Coulomb) (50) (Figura 5). A Equação 1 descreve a função de energia potencial de um sistema de partículas, com seus respectivos termos. A energia potencial do sistema é uma função das coordenadas cartesianas, que especifica as posições de todos os átomos do sistema. Nesta função, representamos os comprimentos de ligação entre os átomos (b), os ângulos de ligação (θ), os ângulos diedros próprios (\emptyset), os ângulos diedros impróprios (ξ) e as distâncias entre as partículas (r). Os parâmetros da função de energia são obtidos de experimentos e estudos da mecânica quântica para pequenas partículas, assumindo que tais parâmetros também são válidos para partículas maiores (52). Geralmente, os campos de força são puramente aditivos, não há dependência entre os termos do campo. Estes campos de força dão uma aproximação do panorama de energia potencial do sistema.

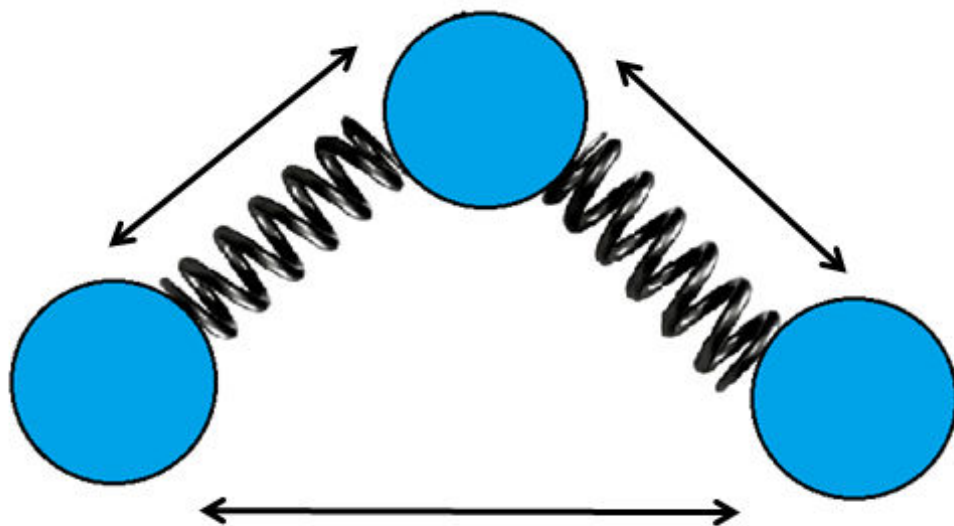


Figura 4: Representação do modelo de esferas e molas da Mecânica Molecular. A figura mostra um conjunto de esferas conectadas por meio de molas e seu comportamento em momentos sucessivos (setas). Ao se aplicar uma força em uma das esferas, haverá um deslocamento na direção da força aplicada que se propagará pelas outras esferas. A velocidade da propagação dependerá da massa (densidade) das esferas e da rigidez (elasticidade) da mola.

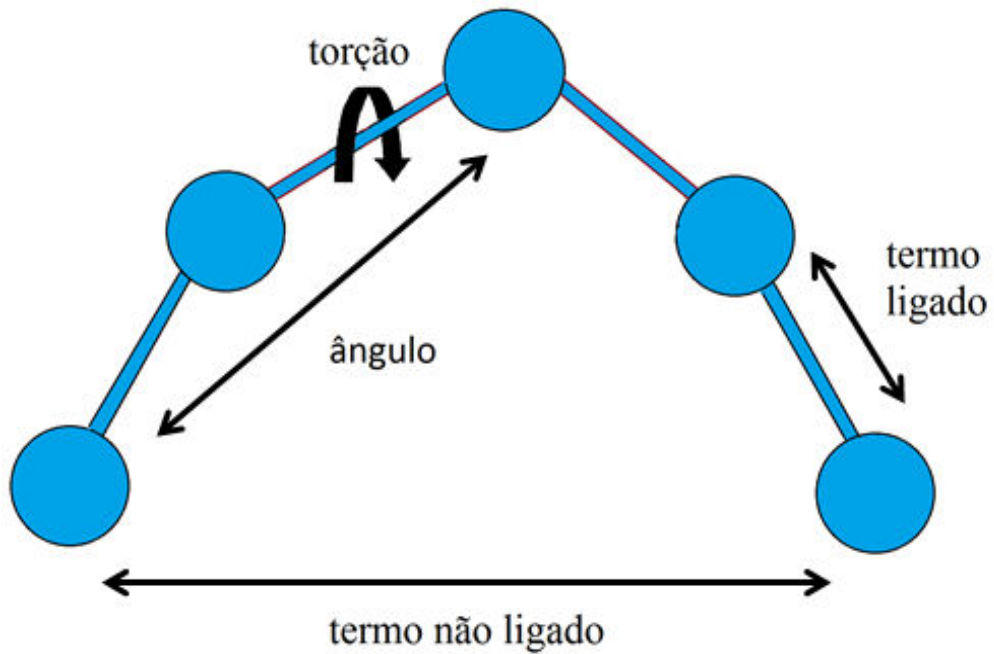


Figura 5: Representação dos termos utilizados na função de energia para a interação entre proteínas. Representação do termo não ligado para o comprimento da ligação entre dois átomos; do ângulo estabelecido na ligação de três átomos; o ângulo de torção e o termo não ligado, computado por meio das forças de van der Waals e da contribuição eletrostática.

$$\begin{aligned}
E(R) = & \frac{1}{2} \sum_{\text{ligações}} K_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\
& + \frac{1}{2} \sum_{\text{diedros próprios}} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \frac{1}{2} \sum_{\text{diedros impróprios}} K_\xi (\xi - \xi_0)^2 \\
& + \sum_{\text{não ligados}} \left(\frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_1 q_2}{Dr} \right) \quad [1]
\end{aligned}$$

O primeiro termo da Equação 1 representa o deslocamento em relação a um comprimento ideal b_0 , computado por um potencial harmônico. A constante K_b determina a flexibilidade da ligação. A energia associada pelas alterações dos ângulos de ligação no segundo termo da equação também são obtidas por um potencial harmônico. Para as rotações em torno das ligações químicas, a função potencial dos ângulos diedros próprios é dada pelo terceiro termo da equação. Assumimos que esse potencial é periódico, sendo modelado por uma função cosseno ou pela soma de funções periódicas, onde o termo δ representa o ângulo de equilíbrio e n a multiplicidade do diedro. O termo relativo ao ângulo diedro impróprio é dado por um potencial harmônico, com uma constante de força K_ξ e um ângulo de equilíbrio ξ_0 . O último termo da equação representa a contribuição dos termos não ligados, e é constituído de três partes: um termo repulsivo de prevenção de distâncias muito próximas entre as partículas (r^{-12}), um termo atrativo para considerar a dispersão de forças de London (r^{-6}) entre os átomos, e um termo eletrostático atrativo ou repulsivo dependendo se as cargas são opostas ou não (r^{-1}). Os coeficientes **A** e **B** são as constantes de interação e dependem dos tipos de átomos envolvidos nas interações, sendo determinados como parâmetros do sistema. As interações eletrostáticas são representadas pelo potencial de Coulomb, e o coeficiente **D** é o valor da constante dielétrica para o meio e r a distância entre as posições das duas cargas pontuais.

De modo geral, a simulação por DM é utilizada para se obter informações a respeito das conformações do sistema e também informações cinéticas e termodinâmicas que ocorrem ao longo do tempo de simulação. Esta abordagem poderia ser uma das grandes vantagens no estudo das interações entre os peptídeos e proteínas do MHC, pois evidenciariam propriedades individuais do movimento das partículas interagentes do sistema. Trata-se de uma poderosa ferramenta para aprofundar o conhecimento e entender o sistema modelado com maior nível de detalhe. A exemplo do que é explorado neste trabalho de tese, macromoléculas biológicas, como as proteínas do MHC, interagindo com peptídeos imunogênicos, são sistemas dinâmicos, e os cálculos baseados em modelos físicos/químicos da dinâmica desses sistemas podem proporcionar novas informações a respeito dos seus movimentos internos e de suas propriedades termodinâmicas (50).

Nos últimos anos, a simulação em escala molecular tem apresentado vários avanços, combinando desenvolvimentos em *hardware* e em algoritmos (52). Uma das dificuldades que envolvem a modelagem de sistemas biomoleculares está relacionada à possibilidade de se encontrar configurações mais estáveis, ou seja, aquelas com menores valores de energia potencial. Na prática, passar de um estado de estabilidade energética para outro significa que o sistema deve vencer barreiras de energia potencial. Assim, alguns sistemas permanecem estáveis em condições de mínimos de energia potencial sem passar para uma nova configuração de estabilidade (54). Para que isso aconteça, devem ocorrer flutuações que levem o sistema a essa mudança. Uma maneira de forçar a ocorrência dessas flutuações é utilizar métodos que acelerem a transição de um mínimo de energia para outro, mediante a inclusão na função de energia potencial de um novo termo, que modifiquem a superfície durante a evolução temporal.

Existem algumas abordagens de simulação que podem acelerar a visita dos estados na superfície de energia livre (SEL), tais como ABF (*Adaptive Biasing Force*) (55), *Umbrella Sampling* (56), *Accelerated Molecular Dynamics* (54), *Conformational Flooding* (57) e a *Metadynamics* (Metadinâmica) (58), entre outros.

1.6 A Metadinâmica e o Uso de Variáveis Coletivas

Na Metadinâmica (MetaD), a amostragem na SEL é aprimorada pela introdução de um potencial histórico-dependente que atua sobre um seletivo número de graus de liberdade para modelagem do sistema, geralmente referidos como variáveis coletivas (VC) (59).

Neste trabalho de tese utilizamos a técnica de MetaD para simular o processo de saída de peptídeos com possível atividade imunogênica, dos sítios de ligação das proteínas H-2, relacionados à resposta imune para linfócitos T no modelo murino de infecção do parasito *Leishmania*. A energia livre de dissociação foi calculada a partir da aplicação desta abordagem.

Seja \mathbf{S} um conjunto de d funções das coordenadas microscópicas \mathbf{R} do sistema.

$$\mathbf{S}(\mathbf{R}) = (S_1(\mathbf{R}), \dots, S_d(\mathbf{R}))$$

No tempo de simulação t , o potencial de energia é descrito como a soma de funções gaussianas (Equação 2) que são depositadas ao longo da trajetória do sistema, no espaço das VCs, com o objetivo de desestimular a revisitação em configurações que já tenham sido percorridas ou amostradas anteriormente.

$$V_G(S, t) = \int_0^t dt' \omega \exp\left(-\sum_{i=1}^d \frac{(S_i(R) - S_i(R(t')))^2}{2\sigma_i^2}\right) \quad [2]$$

onde ω representa a taxa de energia, σ_i a largura das gaussianas, R são as coordenadas do sistema e S são funções de R . A taxa de energia é constante e é expressa em termos da altura da gaussiana (H) e do passo de tempo (τ_G) em que essas funções são adicionadas ao sistema, onde:

$$\omega = \frac{H}{\tau_G} \quad [3]$$

Esse viés potencial é então aplicado continuamente durante a simulação da dinâmica do sistema (60).

As simulações da DM de um sistema de partículas utilizando MetaD apresentam alguns diferenciais quando comparadas com as simulações da DM clássica (59). O primeiro diferencial é a aceleração do processo de amostragem na SEL, de modo a simular a ocorrência de eventos raros, fazendo com que o sistema visite todos os mínimos locais de energia da superfície, que estão separados por grandes barreiras de energia. Além disso, as simulações por MetaD permitem a exploração de novas vias de reação, quando o sistema se desloca de um mínimo de energia livre para outro, passando por um ponto de sela da SEL. Outro diferencial consiste no fato de que nas simulações por MetaD não é preciso ter um conhecimento *a priori* do panorama de energia do sistema, diferentemente de outros métodos como ABF, *Umbrella Sampling*, *Accelerated Molecular Dynamics* e *Conformational Flooding*.. Outro importante diferencial da MetaD é que após decorrido o processo de simulação, o potencial adicionado à função de energia do sistema pode ser usado para estimar a SEL. Há uma relação entre o potencial somado pela MetaD e os valores de energia livre associados ao sistema (Equação 4). A comprovação da convergência da Equação 4 foi demonstrada tanto de forma empírica quanto de modo formal (58, 61-63).

$$V_G (S, t \rightarrow \infty) = -F(S) + C \quad [4]$$

onde C representa uma constante aditiva irrelevante e F(S) é a energia livre definida de acordo com a Equação 5.

$$F(S) = -\frac{1}{\beta} \ln\left(\int dR \delta(S - S(R))e^{-\beta U(R)}\right) \quad [5]$$

onde $\beta = (k_B T)^{-1}$, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura do sistema e U(R) a função potencial de energia.

Como exemplo, na Figura 6 se mostra a atuação da MetaD sobre um potencial de energia unidimensional. É possível observar que o sistema evolui com o decorrer da simulação e as gaussianas são adicionadas à função potencial de energia, representadas em diferentes tempos durante a simulação. Após o preenchimento do último estado de mínimo de energia, todo o perfil da SEL é completamente preenchido, e a simulação se torna difusa ao longo da trajetória da VC. Enquanto o processo de simulação prossegue, o potencial V_G compensa inteiramente a SEL (64).

Nas simulações por MetaD, o potencial V_G não converge em módulo para um valor constante de energia livre. Isto tem como consequência que o potencial de energia pode preencher em excesso a SEL e levar o sistema a regiões de elevados valores de energia livre, que não correspondem à realidade da simulação. Neste caso, para que se possa reconstruir a SEL de forma adequada, a simulação da MetaD deve ser interrompida tão logo o sistema saia do último mínimo de energia e a trajetória da VC se torne difusa (59). Isto constitui uma das limitações do uso desta abordagem.

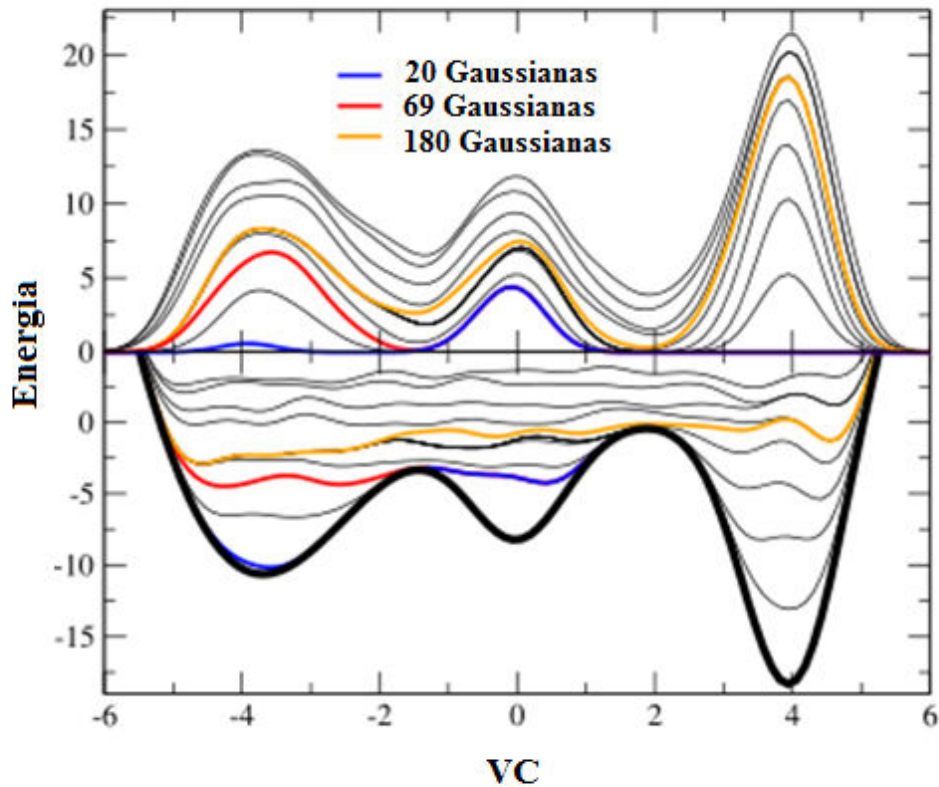


Figura 6: Atuação da MetaD sobre um potencial de energia unidimensional. Painel inferior (soma das funções gaussianas com o potencial de energia inicial do sistema – linha em preto); painel superior (evolução do potencial da MetaD); linha azul (preenchimento do primeiro mínimo explorado na SEL, onde o valor da VC é igual a zero); linha vermelha (potencial da MetaD quando preenche o segundo mínimo de energia (VC = -4)); linha laranja (potencial da MetaD quando preenche o terceiro mínimo (VC= 4)). Adaptada de Laio e Gervasio (64).

A escolha das VCs que irão descrever o sistema é o passo inicial para que se possa utilizar a MetaD, sendo considerada uma etapa fundamental para o uso destes tipos de simulações (59).

As VCs são funções das coordenadas microscópicas do sistema. Essas funções podem ser definidas como distâncias entre átomos ou conjunto de átomos, ângulos, ângulos diedros, número de coordenação, e vários outros tipos de funções. Além disso, é possível definir VCs como polinômios de grau n , utilizando vários tipos dessas funções no seu arranjo. No entanto, para que as VCs possam ser utilizadas de forma efetiva nas simulações por MetaD, elas devem satisfazer a três propriedades básicas (59, 64):

- Distinguir entre os estados inicial e final do sistema a ser simulado e descrever todos os estados intermediários relevantes entre eles;
- Incluir todos os modos lentos do sistema, isto é, aquelas variáveis que demandam muito tempo de simulação para se estabilizar. Por outro lado, o que se espera ao escolher como VCs aquelas que descrevem apenas os modos lentos da simulação, é que os parâmetros que descrevem os modos mais rápidos do sistema, possam se ajustar rapidamente durante a evolução das variáveis mais lentas (59).
- Utilizar um conjunto reduzido de VCs para descrever o problema, evitando assim a exploração de um espaço multidimensional, o que precisaria muito tempo de simulação, além do fato que analisar uma SEL obtida nessas condições pode se tornar uma tarefa complicada.

A utilização das VCs tem como objetivo reduzir as dimensões da SEL associada ao problema.

Sendo assim, a tarefa de definição das VCs não é um processo trivial e não há uma regra *a priori* para se encontrar o conjunto adequado de VCs que serão utilizadas nas simulações por MetaD. O fato básico é que para a escolha do conjunto de VCs necessitamos do entendimento a respeito do sistema biológico em questão, de modo que se possa definir o conjunto de VCs que esteja de acordo com as três propriedades básicas descritas acima (64).

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Examinar o evento de dissociação de epítomos das proteínas H-2, tendo como modelo de estudo epítomos preditos da extensão COOH-terminal da CPB de *Leishmania (L.) amazonensis*.

2.2 *Objetivos Específicos*

- a) Validar o processo de dissociação de peptídeos da fenda de haplótipos H-2 (L^d , K^k , K^d e D^b) de complexos cristalizados;
- b) Analisar a trajetória de saída e a energia de dissociação dos peptídeos derivados da *cyspep* de seus respectivos receptores H-2 (D^b e L^d);
- c) Investigar as interações moleculares entre os resíduos de aminoácidos dos complexos peptídeos derivados da *cyspep*/proteínas H-2 de classe I;
- d) Correlacionar os dados dos ensaios de dissociação com as respostas biológicas dos peptídeos derivados da *cyspep*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

No desenvolvimento desse trabalho utilizamos a abordagem de simulação dinâmica molecular de proteínas por MetaD (58) para avaliar o processo de dissociação dos peptídeos da fenda da proteína H-2 de classe I.

O procedimento foi constituído de cinco etapas: (1) seleção dos epítomos da *cyspep*; (2) seleção dos complexos H-2/peptídeos para a validação da MetaD; (3) simulação da dissociação dos peptídeos nos complexos do conjunto de validação; (4) simulação da dissociação dos epítomos preditos da *cyspep* e (5) avaliação das interações moleculares entre esses epítomos e os resíduos da fenda da proteína H-2 de classe I.

3.1 Seleção dos Epítomos da *Cyspep*

Sete peptídeos derivados da *cyspep*, identificados como potenciais moléculas imunogênicas capazes de interagir com a proteína H-2 de classe I (39), foram submetidos à simulação por meio da MetaD. Destes peptídeos, três formaram complexos com o receptor H-2 D^b, dois formaram complexos com o receptor H-2 L^d e outros dois formaram complexos com ambos haplótipos do H-2. As sequências de aminoácidos destes peptídeos (Tabela 1) foram derivadas de duas sequências de aminoácidos que apresentaram propriedades imunogênicas em ensaios com camundongos BALB/c (H-2 haplótipo L^d) e C57BL/6 (H-2 haplótipo D^b) infectados com *L. (L.) amazonensis*: VMVEQVICFD e FCLGGGLCL (39).

Utilizamos neste trabalho, o resultado da avaliação destas duas sequências originais, submetidas ao algoritmo online SYFPEITHI (42), para prever potenciais epítomos capazes de se ligarem à fenda da proteína H-2 de classe I. O potencial de ligação foi calculado por uma matriz de pontuação bidimensional. A determinação da pontuação de cada sequência está relacionada com a posição dos aminoácidos nos sulcos. A pontuação total da sequência foi o somatório das pontuações de cada aminoácido. O algoritmo atribui o valor de 10 pontos para os aminoácidos frequentemente descritos como âncora da ligação do peptídeo com a proteína H-2 de classe I; 8 para aqueles que estão presentes na mesma posição em um número significativo de ligantes armazenados no banco de dados do SYFPEITHI; 6 aos resíduos que ocorrem raramente naquela posição ou que auxiliam o posicionamento

do resíduo âncora da ligação; 4 os que apresentam menor frequência de ocorrência naquela posição no banco de dados do SYFPEITHI e um valor entre 1 e 4 para aminoácidos com ocorrência individual na sequência. Para selecionar os peptídeos foi utilizado um critério de corte pontuação ≥ 8 , pois esse valor indica a existência de pelo menos um aminoácido-âncora principal o que é essencial para a ligação entre o epítipo e a fenda da proteína H-2.

A estrutura dos complexos H-2 de classe I/peptídeos derivados da *cyspep* foram submetidas ao servidor Rossetta FlexPepDock (86) para refinamento, utilizando as opções padrão deste servidor.

Portanto, nosso trabalho avaliou como ocorre a interação desses epítipos com a proteína H-2 de classe I por meio da simulação da saída dos peptídeos da fenda da proteína, utilizando MetaD.

3.2 Escolha dos Complexos H-2/peptídeos para Validação da MetaD

Para esta etapa, utilizamos um conjunto de validação com complexos de haplótipos diferentes, cujos peptídeos ligados contêm oito, nove e dez aminoácidos. As escolhas dos complexos cristalográficos, onde os peptídeos têm diferentes comprimentos de sequência, levaram em conta que estes também são os tamanhos dos peptídeos derivados da *cyspep* apresentados nos complexos a serem avaliados neste trabalho. Utilizamos quatro complexos de haplótipos diferentes (Figura 7), incluindo complexos dos haplótipos D^b e L^d no conjunto de validação, visto serem estes os que foram utilizados como receptores dos peptídeos derivados da *cyspep*.

As estruturas cristalográficas foram obtidas da base de dados do PDB (65) sob os códigos 1ld9 (66), 1vgk (67), 1zt1 (45) e 1yn6 (68), com resoluções de 2,4 Å, 2,0 Å, 2,5 Å e 2,2 Å, respectivamente. O arquivo do PDB sob o código 1zt1 contém a estrutura do haplótipo K^k da proteína H-2 de classe I (H-2 K^k) formando um complexo com um peptídeo de oito aminoácidos do vírus da influenza A. O arquivo 1yn6 corresponde à estrutura cristalográfica do haplótipo D^b da proteína H-2 de classe I (H-2 D^b) formando um complexo com um peptídeo de dez resíduos derivado da ácidopolimerase da influenza A. Finalmente, os arquivos 1ld9 e 1vgk correspondem às estruturas dos haplótipos L^d (H-2 L^d) e K^d (H-2 K^d), das proteínas H-2 de classe I, respectivamente, ambos os complexos contêm sequências diferentes de nove aminoácidos (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de aminoácidos dos peptídeos dos complexos avaliados

Identificador dos complexos	Haplótipo	Sequência aa
1*	L ^d	YPNVNIHNF
2*	K ^d	SYVNTNMGL
3*	K ^k	FEANGNLI
4*	D ^b	SSLENFRAYV
5	D ^b	FCLGGGLCL
6	D ^b	VMVEQVICF
7	D ^b	VEQVICFD
8a	D ^b	CLGGGLCL
9a	D ^b	VMVEQVICFD
8b	L ^d	CLGGGLCL
9b	L ^d	VMVEQVICFD
10	L ^d	FCLGGGLC
11	L ^d	MVEQVICFD

(*) Complexos PDB: 1=1ld9; 2=1vgk; 3=1zt1 e 4=1yn6

As áreas em branco mostram o conjunto de validação enquanto a área em cinza mostram os complexos com peptídeos derivados da *cyspep*.

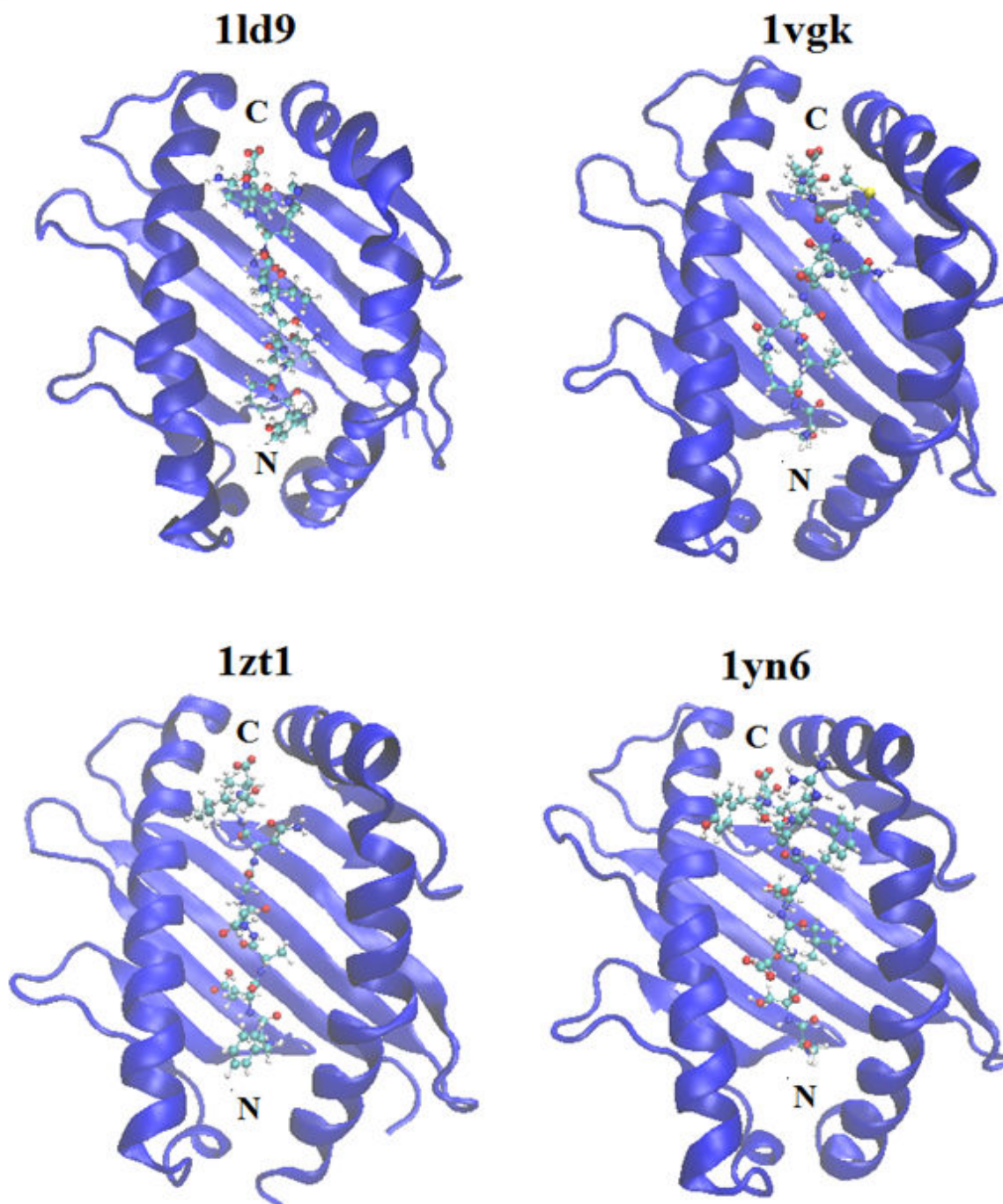


Figura 7: Imagem dos complexos cristalográficos 1ld9, 1vgk, 1zt1 e 1yn6, usados como conjunto de validação para a técnica da MetaD. As cadeias alfa da fenda (azul) das proteínas H-2 de classe I estão representadas em *new cartoon* e os peptídeos ligados à fenda, em *CPK*. São destacadas as regiões NH₂-terminal (N) e COOH-terminal (C) dos peptídeos.

3.3 Parâmetros das Simulações da Dinâmica Molecular

Para cada complexo, foram gerados novos arquivos no formato PDB e PSF (com a divisão por cadeias de proteínas) de modo que estes apresentem as prováveis coordenadas dos átomos de hidrogênio. Para isso, foi utilizada a ferramenta do programa de visualização molecular VMD (69) juntamente com o campo de força CHARMM e seus arquivos de definição de topologia (70).

Os complexos H-2 de classe I/peptídeos foram imersos em caixas ortorrômbicas de volume aproximado de dimensão $65 \times 65 \times 80 \text{ \AA}^3$. A direção de saída dos peptídeos foi alinhada ao eixo z, perpendicular ao plano da fenda, em todos os casos. Os sistemas foram hidratados considerando uma distância de 5 \AA a partir das posições mínimas e máximas das coordenadas dos complexos. Na direção z, as moléculas de solvente foram adicionadas até uma distância de 30 \AA , no sentido de saída do peptídeo da fenda, de modo que o peptídeo pudesse se movimentar em direção ao solvente. Os complexos foram computacionalmente hidratados com aproximadamente 8500 moléculas de água do tipo TIP3P (71). Os parâmetros utilizados nas condições periódicas de contorno (CPC) foram definidos de acordo com as condições específicas encontradas em cada um dos complexos, utilizando as coordenadas do seu centro geométrico como centro da caixa e as suas coordenadas de mínimos e máximos, em cada uma das direções, para definir as dimensões de cada eixo. As definições das dimensões das caixas de simulação foram feitas de modo a serem suficientemente grandes para os complexos não interagirem com suas imagens nas células do CPC das suas vizinhanças. Todos os complexos H-2 de classe I/peptídeos foram neutralizados através da adição de íons de Na^+ , com o objetivo de evitar artefatos computacionais no cálculo das interações eletrostáticas.

Todas as simulações foram executadas utilizando o software NAMD V2.9 (72), aplicando o campo de força CHARMM27 (70) e utilizando o arquivo de parâmetros `par_all27_prot_lipid.inp`. As interações eletrostáticas foram avaliadas usando o método de *Particle Mesh Ewald* (PME) com grade de espaço de 1 \AA . Interações de longa distância foram truncadas usando um raio de corte de 12 \AA , com função de comutação no raio de 10 \AA .

As equações do movimento foram integradas usando o algoritmo *velocity Verlet* (73) com passo de tempo de 2 fs (femtosegundos). O algoritmo SHAKE (74)

foi usado para manter fixas todas as ligações covalentes com os átomos de hidrogênio.

Na etapa de minimização de energia potencial dos complexos, a otimização das geometrias consistiu de 15000 passos pelo método *steepest descent*, onde em cada um dos sistemas mantivemos os átomos da cadeia principal sob a ação de um potencial harmônico, cuja constante de força elástica foi de 0,25 kcal/mol/Å².

A partir da etapa de minimização de energia das estruturas, foram executadas as simulações de equilíbrio em três estágios: 1) mantendo a pressão constante em 1 atm e aumentando a temperatura de forma incremental de 0 K até 310 K, em períodos de 6 ps (picossegundos); 2) equilibrando as estruturas no *ensemble* NPT durante 1 ns, aplicando restrições harmônicas para evitar grandes deslocamentos dos átomos da cadeia principal da proteína e do peptídeo; 3) finalmente, as estruturas foram equilibradas no *ensemble* NPT durante um período extra de 1 ns, mantendo as restrições harmônicas apenas para os átomos da cadeia principal da proteína H-2 de classe I.

Na etapa de equilíbrio, as restrições harmônicas aplicadas na cadeia principal das proteínas e dos peptídeos tiveram um valor de constante de força elástica também de 0,25 kcal/mol/Å². Este protocolo garante que as moléculas de água, que foram mantidas livres durante todo esse procedimento, relaxassem e se acomodassem ao redor da proteína. Como resultado final obtivemos sistemas de partida com estruturas mais estáveis para serem utilizadas nas simulações por MetaD. Além disso, todas as simulações no *ensemble* NPT foram realizadas a uma temperatura de 310 K e pressão de 1 atm, aplicando os métodos da dinâmica e pistão de Langevin. Para a dinâmica de Langevin foi aplicado coeficiente de amortecimento de 5 ps⁻¹ em todos os átomos, com exceção dos átomos de hidrogênio. O pistão de Langevin teve os seguintes parâmetros: para o controle da pressão, as interações dos átomos de hidrogênio foram computadas em grupos; por ser o sistema inserido em uma caixa de simulação, não foi permitido que as três dimensões das células da CPC variassem independentemente; o período do pistão foi definido em 100 fs e o tempo de relaxação foi de 50 fs.

Para as simulações por MetaD, a altura das gaussianas foi definida em 0,5 kcal/mol e novas gaussianas foram adicionadas ao potencial de energia a cada 0,2 ps. O tamanho relativo das gaussianas foi mantido em $\frac{\sqrt{2\pi}}{2}$ (valor padrão do software NAMD)

Para cada complexo do conjunto de teste, foram executadas simulações da DM clássica como controle do processo, utilizando os mesmos parâmetros que a MetaD.

Tanto as simulações por MetaD e as simulações de controle da DM clássica foram executadas durante 10 ns e os resultados foram visualizados e analisados utilizando o programa VMD (69).

A primeira VC (VC1) foi definida como a distância entre o resíduo P6 do peptídeo (de acordo com a notação de Madden (75)) e o resíduo Trp147 (resíduo conservado da fenda do H-2 de classe I). A segunda VC considerada (VC2) foi o ângulo determinado pela semirreta que liga o centro de massa do peptídeo ao resíduo P6 do peptídeo e a semirreta que liga os centros de massa do peptídeo e da proteína. Estabelecemos a variação de VC1 dentro de uma faixa comprimento que se estende de 0 Å e 28 Å, com incrementos de 1 Å. Já a variável coletiva VC2 oscilou na faixa entre 0° e 180°, com incrementos de 10°.

3.4 Avaliação dos Resultados das Simulações

Para construção da SEL em função das VCs, onde mostramos as regiões de mínimos de energia associadas aos estados do peptídeo ligado à proteína e livre computacionalmente na solução aquosa, utilizamos o software R (76).

As projeções da SEL sobre o plano energia X distância (VC1) foram obtidas através da integração do fator de Boltzmann sobre a variável coletiva VC2, conforme a Equação 6.

$$-\beta\omega_{VC2}(VC1) = \ln \frac{\int e^{-\beta\omega(VC1,VC2)} dVC2}{\int \int e^{-\beta\omega(VC1,VC2)} dVC2 dVC1} \quad [6]$$

onde $\beta = 1/k_b T$ e k_b é a constante de Boltzmann para a temperatura $T = 310K$ e ω representa o valor de energia livre na posição relativa ao par de valores das variáveis coletivas (VC1, VC2).

O cálculo da área da superfície do peptídeo exposta ao solvente, o número de suas ligações de hidrogênio com o receptor H-2, e a sua energia de interação com a

fenda da proteína (computando os componentes eletroestático e van der Waals), foram calculados utilizando o software VMD (69).

A formação da ligação de hidrogênio foi considerada quando a distância entre os átomos eletronegativos (doador e receptor) foi menor do que 3,5 Å e o cosseno do ângulo formado entre o doador, o átomo de hidrogênio da ligação e o receptor variou entre -0,9 e -1, o que corresponderia aos ângulos $\sim 160^\circ$ e 180° , respectivamente.

Particularmente, para o cálculo dos valores de energia de interação dos peptídeos com a fenda do H-2 a cada quadro da simulação, utilizamos extensão do software VMD denominada NAMD Energy. Para isso, selecionamos os resíduos da proteína H-2 de classe I e dos peptídeos separadamente, de modo que pudéssemos avaliar a energia de interação entre eles. Neste procedimento, as interações de longa distância foram truncadas em 12 Å com aplicação da função de comutação no raio de 10 Å.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania*, a sua fase no hospedeiro vertebrado demanda mecanismos que possam influenciar no sucesso desta adaptação, culminando na manutenção das formas amastigotas o que favorece a sustentação do ciclo após um novo repasto sanguíneo pelo inseto vetor. A reconstrução destes passos biológicos, principalmente os detalhes moleculares que definem os eventos de sinalização da resposta imune celular que contribuem na adaptação do parasito, é um desafio, e estes detalhes moleculares são definidos pelos complexos formados com as proteínas do MHC e peptídeos imunogênicos da *Leishmania*.

Não obstante, várias condições desses processos já serem conhecidos para alguns modelos de doença parasitária (77, 78) e degenerativas (79, 80), o mesmo não é possível afirmar para o modelo de infecção por *Leishmania* spp. Especificamente, ainda não é completamente conhecido o modo de ligação dos peptídeos imunogênicos derivados da região COOH-terminal da cisteíno-proteinase B de *L. (L.) amazonensis*, que influenciam no curso da adaptação deste parasito no hospedeiro vertebrado (15, 39). Com esta motivação, investimos em uma abordagem computacional para o estudo do processo de saída destes peptídeos da fenda de ligação da proteína H-2 de classe I, e com isso buscamos contribuir no entendimento das interações moleculares que ocorrem durante este processo.

A abordagem computacional utilizada neste trabalho também nos permitiu reconstruir a superfície de energia livre (SEL) associada ao processo de saída destes peptídeos imunogênicos, desvendando a energia livre de dissociação estabelecida entre os peptídeos e a proteína H-2 de classe I, analisar as interações moleculares que ocorrem entre os peptídeos e os receptores H-2, correlacionar as possíveis respostas biológicas destes peptídeos com os dados obtidos nos ensaios computacionais e estabelecer as condições necessárias para que a ligação destes epítomos à proteína H-2 efetivamente ocorra.

4.1 Determinação das Variáveis Coletivas

Nas primeiras etapas deste estudo, foi crucial determinar os pares VCs que definem a trajetória de saída do peptídeo da fenda da proteína H-2 de classe I, nos ensaios de MetaD proposto neste trabalho de tese. Os pares selecionados para teste foram obtidos através de uma análise das características dos complexos H-2 de classe I/peptídeos relatadas na literatura científica, como resíduos conservados do sítio de ligação do receptor, conformação do peptídeo na fenda, entre outras (43, 45, 75, 81).

Uma das características observadas nestes complexos está relacionada ao tipo de conformação que a região COOH-terminal do peptídeo adota na cavidade da proteína, o que pode acarretar na projeção dos resíduos P5, P6 e P7 para fora da fenda do receptor H-2 (81). Além disso, os resíduos da região COOH-terminal dos peptídeos formam ligações com resíduos conservados da fenda das proteínas H-2, em particular com o resíduo Trp147 (43). Foram testados 13 combinações de pares de VCs, de modo que pudéssemos verificar se houve variação significativa na área acessível exposta ao solvente (SASA, do inglês *Solvent Accessible Surface Area*) do peptídeo e na energia de interação intermolecular entre o peptídeo e a proteína (Tabela 2). Para 12 desses pares, os coeficientes de variação dessas duas propriedades foram menores que 10% das médias observadas durante os ensaios de teste da MetaD, o que significa que não houve variação significativa desses valores (82, 83) e o peptídeo se manteve ligado à proteína durante todo o processo de simulação. Portanto, os pares com coeficientes de variação menores do que 10% para essas duas propriedades foram rejeitados para serem utilizados nos ensaios de MetaD. Utilizando o primeiro par de VCs na Tabela 2, foi possível simular a saída do peptídeo da proteína H-2 nos ensaios de MetaD. O par é formado pela distância entre o resíduo P6 do peptídeo e o resíduo Trp147 do receptor H-2, e o ângulo formado pela semirreta que liga o centro de massa do peptídeo ao resíduo P6 e a semirreta que liga os centros de massa dos peptídeos e da proteína H-2 (Figura 8). A primeira variável coletiva (VC1) descreve o distanciamento do peptídeo em relação à proteína do H-2 de classe I, enquanto que a segunda variável coletiva (VC2) descreve a orientação relativa do peptídeo em relação ao receptor.

Tabela 2: Pares de variáveis coletivas testadas para as simulações por MetaD

Nº de teste	VC1	VC2	C_v^{***} área acessível exposta ao solvente	C_v^{***} energia de interação peptídeo e proteína
1	Distância entre o resíduo P6 do peptídeo e o resíduo 147 da proteína H-2	Ângulo formado entre resíduo P6 do peptídeo, CM1* e CM2**	28,06%	57,06%
2	Distância entre o resíduo P5 do peptídeo e o resíduo 147 da proteína H-2	Ângulo formado entre resíduo P5 do peptídeo, CM1* e CM2**	9,75%	9,02%
3	Distância entre os centros de massa dos resíduos P5 e P6 peptídeo (juntos) e CM2**	Ângulo formado entre os resíduos P5 e P6 do peptídeo (juntos), CM1* e CM2**	7,87%	8,83%
4	Distância entre o resíduo P1 do peptídeo e CM2**	Ângulo formado entre resíduo P1 do peptídeo, CM1* e CM2**	6,70%	8,41%
5	Distância entre o resíduo P(Ω) do peptídeo e CM2**	Ângulo formado entre resíduo P(Ω) do peptídeo, CM1* e CM2**	7,98%	7,48%
6	Distância entre CM1* e CM2**	Ângulo formado entre resíduo P1 do peptídeo, CM1* e CM2**	6,23%	7,03%
7	Distância entre CM1* e CM2**	Ângulo formado entre resíduo P(Ω) do peptídeo, CM1* e CM2**	7,05%	8,45%
8	Distância entre CM1* e CM2**	Ângulo formado entre resíduo P(Ω) do peptídeo, CM1* e resíduo P1 do peptídeo	8,01%	7,76%
9	Distância entre CM1* e CM2**	Ângulo formado entre resíduo P(Ω) do peptídeo, CM2** e resíduo P1 do peptídeo	7,89%	8,34%
10	Distância entre o resíduo P1 do peptídeo e CM2**	Distância entre resíduo P(Ω) do peptídeo e CM2**	8,94%	7,09%
11	Distância entre o resíduo P6 do peptídeo e o resíduo 147 da proteína H-2	Ângulo formado entre resíduo P6 do peptídeo, CM1** e uma posição fixa	9,30%	9,77%
12	Ângulo formado entre resíduo P(Ω) do peptídeo, CM2** e o resíduo P1 do peptídeo	Ângulo formado entre resíduo P6 do peptídeo, resíduo 147 da proteína H-2 e CM2**	7,34%	8,01%
13	Número de coordenação do resíduo P1 do peptídeo em relação ao sitio de ligação da proteína H-2	Número de coordenação do resíduo P9 do peptídeo em relação ao sitio de ligação da proteína H-2	6,45%	6,90%

(*) Centro de massa do peptídeo

(**) Centro de massa da proteína H-2

(***) Coeficiente de variação

A linha em fundo cinza representa o par de VCs escolhido para os ensaios de MetaD

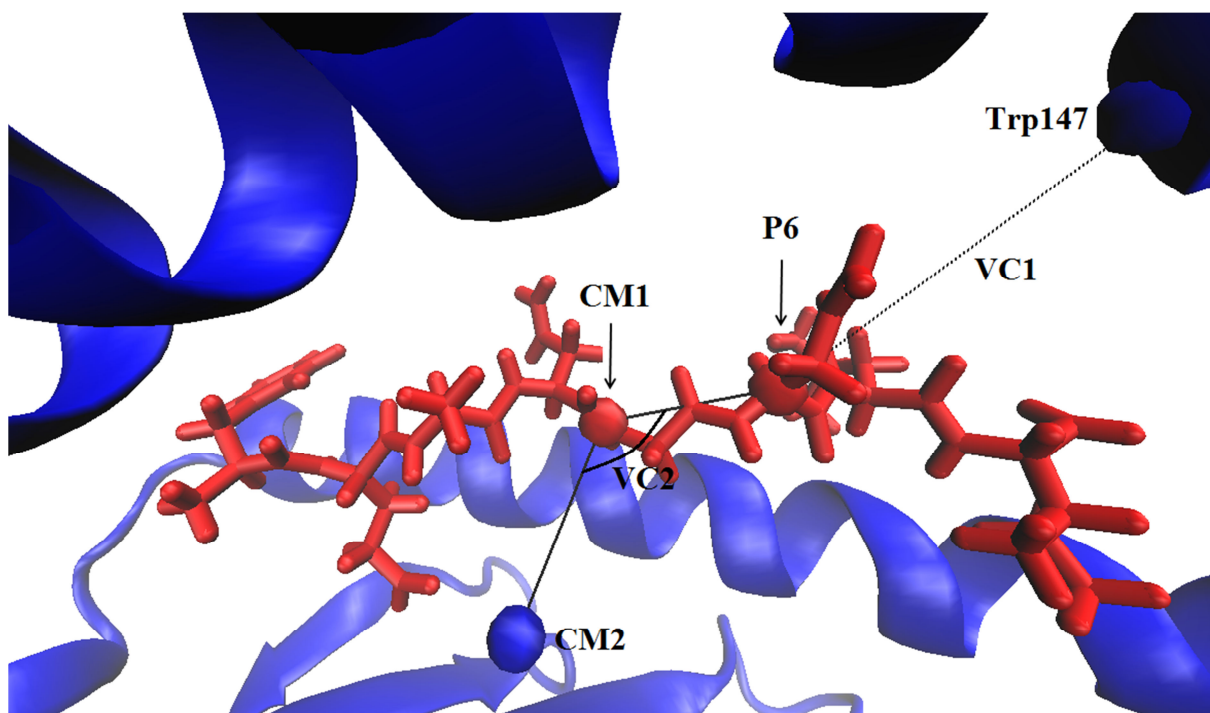


Figura 8: Variáveis coletivas VC1 e VC2. CM1 representa o centro de massa do peptídeo (esfera vermelha). CM2 representa o centro de massa da proteína H-2 de classe I (esfera azul). P6 representa o resíduo 6 do peptídeo (esfera vermelha). Trp147 representa o resíduo conservado 147 da proteína H-2 de classe I (esfera azul). A variável coletiva VC1 (distância) é representada pela linha pontilhada em preto. A variável coletiva VC2 (ângulo) é representada pelo ângulo formado pelas linhas cheias em preto.

4.2 Validação dos Ensaios de Metadinâmica

Embora tenha havido grandes avanços em hardware e software, as simulações clássicas da dinâmica molecular ainda apresentam limitações para estimar de maneira confiável e em tempos acessíveis os valores de energia livre de ligação associados a alguns processos biológicos, incluindo a ligação entre peptídeos e as moléculas do H-2 de classe I (54). Um dos maiores entraves relacionado a este problema consiste na incapacidade de se explorar toda a SEL associada ao processo biológico em questão e conseqüentemente à determinação dos estados de mínimos locais localizados nestas superfícies (59).

O problema acentua-se quando consideramos que componentes do sistema que tenham um alto grau de flexibilidade, como é o caso dos peptídeos que interagem com as proteínas H-2 de classe I, possam dar origem a SEL mais complexas, sendo mais difíceis de serem construídas. Esta dificuldade também é observada pelo fato de existir uma grande contribuição da componente entrópica dos peptídeos em solução, devido ao considerável número de microestados possíveis de serem visitados durante a simulação da dinâmica molecular. Portanto, a simulação em escala molecular do processo de associação entre a proteína H-2 de classe I e peptídeos não é um processo trivial. Desta forma, ao longo deste trabalho propomos simular o processo de dissociação dos peptídeos da fenda dos receptores H-2 de classe I, de modo ser possível calcular a energia livre de dissociação por meio dos valores de energia livre obtidos nos estados do peptídeo livre e ligado à fenda da proteína.

4.2.1 Construção da SEL para os Complexos do Conjunto de Validação

Uma questão crítica para as simulações por MetaD está associada à determinação do momento em que o ligante pode ser considerado computacionalmente livre no solvente, sem estar sob a influência da interação com a proteína. Quando as simulações por MetaD são executadas, as funções gaussianas vão sendo depositadas periodicamente em um mínimo local até que o sistema seja deslocado para fora deste, ocupando então um novo mínimo local na SEL, quando o acúmulo destas funções se reinicia (59). No presente estudo, o número de funções gaussianas adicionadas ao potencial de energia até que a primeira região de mínimo fosse preenchida foi de 7500 (1,5ns), 17500 (3,5ns), 15500 (3,1ns) e 17000 (3,4ns),

para os complexos cristalográficos 1ld9, 1vgk, 1zt1, e 1yn6, respectivamente, onde os valores em parêntesis representam o tempo de simulação correspondente para cada um deles (Tabela 3 e Figura 9).

Em situações onde os sistemas biológicos apresentam dois valores principais de mínimos locais de energia, como no caso dos complexos H-2/peptídeos, a simulação por MetaD primeiramente preenche a região da SEL correspondente ao primeiro mínimo (estado ligado do peptídeo), e depois preenche a região correspondente ao segundo mínimo (estado não ligado do peptídeo, estado computacional livre na solução aquosa). Em casos como este, a simulação da MetaD deve ser finalizada imediatamente quando o ligante deixa o segundo mínimo de energia, antes de iniciar o processo de revisitação no primeiro estado de mínimo de energia (62). Este processo de revisitação do ligante no primeiro estado de mínimo de energia é conhecido como *recrossing*. E este processo produz um excesso na adição de funções gaussianas ao potencial de energia, implicando no risco da visitação em regiões cujo resultado da MetaD não converge para SEL (62).

Acompanhamos o momento de ocorrência do processo de *recrossing* nos ensaios da MetaD através da avaliação dos mapas de energia livre criados ao longo do tempo de simulação (Figura 9). Os mapas foram salvos a cada período de 1 ps (picossegundo) e mostram a mudança no perfil de energia livre como uma função das variáveis VC1 e VC2. O mínimo global de energia livre pode ser obtido de cada um dos mapas e está associado à localização na SEL onde a MetaD está preenchendo as regiões de mínimo de energia. As coordenadas do mínimo global são dadas por um par ordenado (VC1, VC2), e o comportamento da coordenada VC1 foi assumido como determinante da localização do peptídeo nos mínimos locais relacionados aos estados ligados ou não-ligados à fenda da proteína. Desta forma, nossos dados indicaram que o processo de *recrossing* inicia quando a localização do mínimo global nos mapas de energia livre atinge um valor de coordenada VC1 ≥ 20 Å, o que corresponde ao estado do peptídeo fora dos domínios α_1 e α_2 da proteína H-2.

Tabela 3: Tempos de corte para simulação da MetaD

Identificador dos complexos	Haplótipo	Tempo de corte da simulação por MetaD (ns)	Número de gaussianas adicionadas para preencher o primeiro mínimo de energia**
1*	L ^d	2,5	7500 (1,5)
2*	K ^d	5,3	17500 (3,5)
3*	K ^k	5,4	15500 (3,1)
4*	D ^b	4,8	17000 (3,4)
5	D ^b	2,8	10000 (2,0)
6	D ^b	2,8	8500 (1,7)
7	D ^b	3,3	10500 (2,1)
8a	D ^b	2,6	8000 (1,6)
9a	D ^b	2,8	8500 (1,7)
8b	L ^d	3,2	12500 (2,5)
9b	L ^d	3,3	7500 (1,5)
10	L ^d	3,0	9000 (1,8)
11	L ^d	1,5	4500 (0,9)

(*) Complexos PDB: 1=1ld9; 2=1vgk; 3=1zt1 e 4=1yn6

(**) Em parêntesis o tempo de simulação em ns correspondente ao número de funções gaussianas adicionadas ao potencial de energia até que a simulação possa encontrar o primeiro mínimo de energia na SEL.

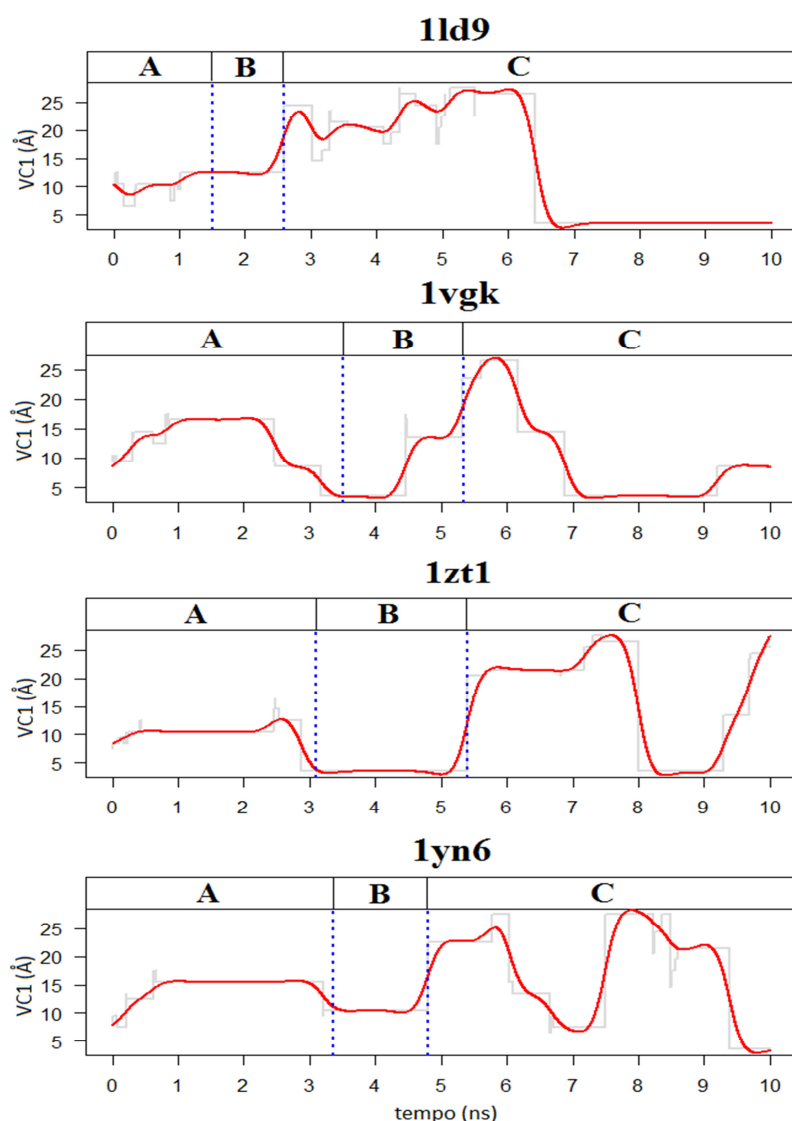


Figura 9: Representação da localização do mínimo global das SELs dos complexos de validação. Durante os ensaios de MetaD foi possível localizar as coordenadas do mínimo global dos complexos cristalográficos (1ld9, 1vgk, 1zt1 e 1yn6). No gráfico, a região sinalizada como (A) representa a localização do mínimo global da SEL, durante o tempo de simulação até o preenchimento do primeiro estado de estabilidade na SEL. A região (B) representa a localização do mínimo global, durante o tempo de simulação para o preenchimento do segundo estado de estabilidade na SEL. Finalmente, a região (C) representa a localização do mínimo global quando se inicia o processo de *recrossing* ($VC1 \geq 20$ Å). A função de regressão *smooth.spline* do software R foi utilizada para obter a linha de tendência do gráfico ao longo do tempo (—). A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo dos ensaios de MetaD em ns e a escala do eixo vertical os valores em Ångstrom (Å) da coordenada VC1 do mínimo global da SEL.

Os mapas de energia livre considerados para os cálculos da energia de dissociação dos peptídeos foram aqueles correspondentes aos tempos de simulação atingidos imediatamente após o preenchimento do segundo mínimo da SEL, antes do início do processo de *recrossing*. Utilizando este critério, podemos observar que para o complexo 1ld9 a MetaD preencheu mais rapidamente os mínimos locais da SEL, seguido dos complexos 1yn6, 1vgk e 1zt1 (Tabela 3 e Figura 9).

A saída mais rápida do peptídeo no complexo 1ld9 pode ser explicada pelo fato do peptídeo, neste complexo, não possuir um resíduo âncora central com a proteína, por conta da presença de vários resíduos de aminoácidos com cadeias laterais volumosas na parte central da fenda.

A SEL foi construída em função das variáveis coletivas VC1 e VC2, utilizando o mapa de energia livre considerado no ponto de corte da MetaD. O estado inicial do peptídeo ligado à fenda corresponde à posição geométrica cristalográfica do peptídeo no arquivo do PDB, enquanto que o estado do peptídeo livre corresponde ao estado do peptídeo fora do sítio de ligação da proteína (Figuras 10 e 11).

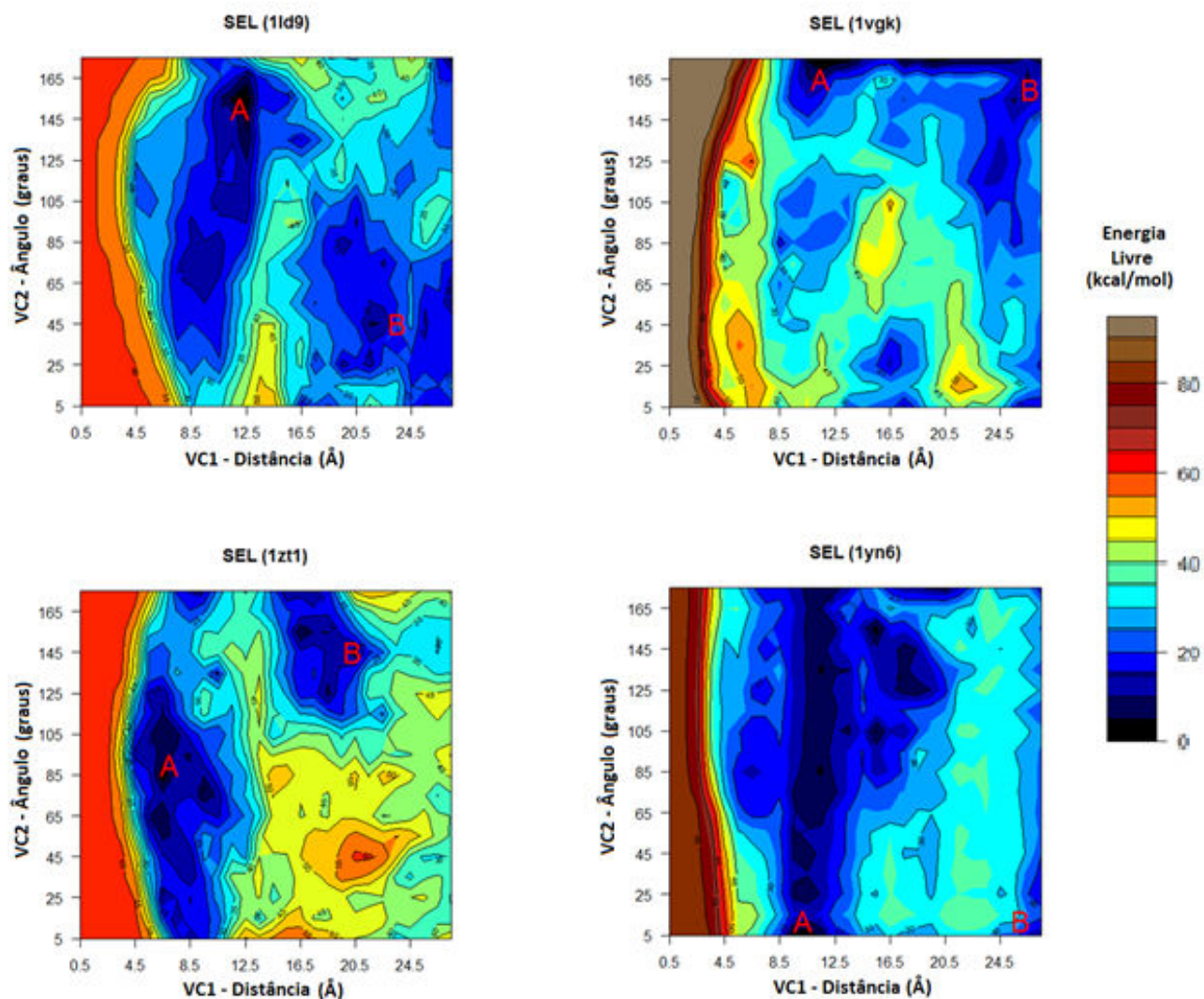


Figura 10: Representação bidimensional das SELs para as estruturas cristalográficas. Na figura são indicados o estado ligado (A) e o estado livre (B) dos peptídeos cristalográficos. Na escala cromática à direita dos mapas, cada cor indica uma variação de 5 kcal/mol. Os mapas foram construídos em intervalos da distância em Ångstrom para a VC1 e em intervalos de graus para a VC2, representando a energia associada a cada par ordenado de valores dessas VCs.

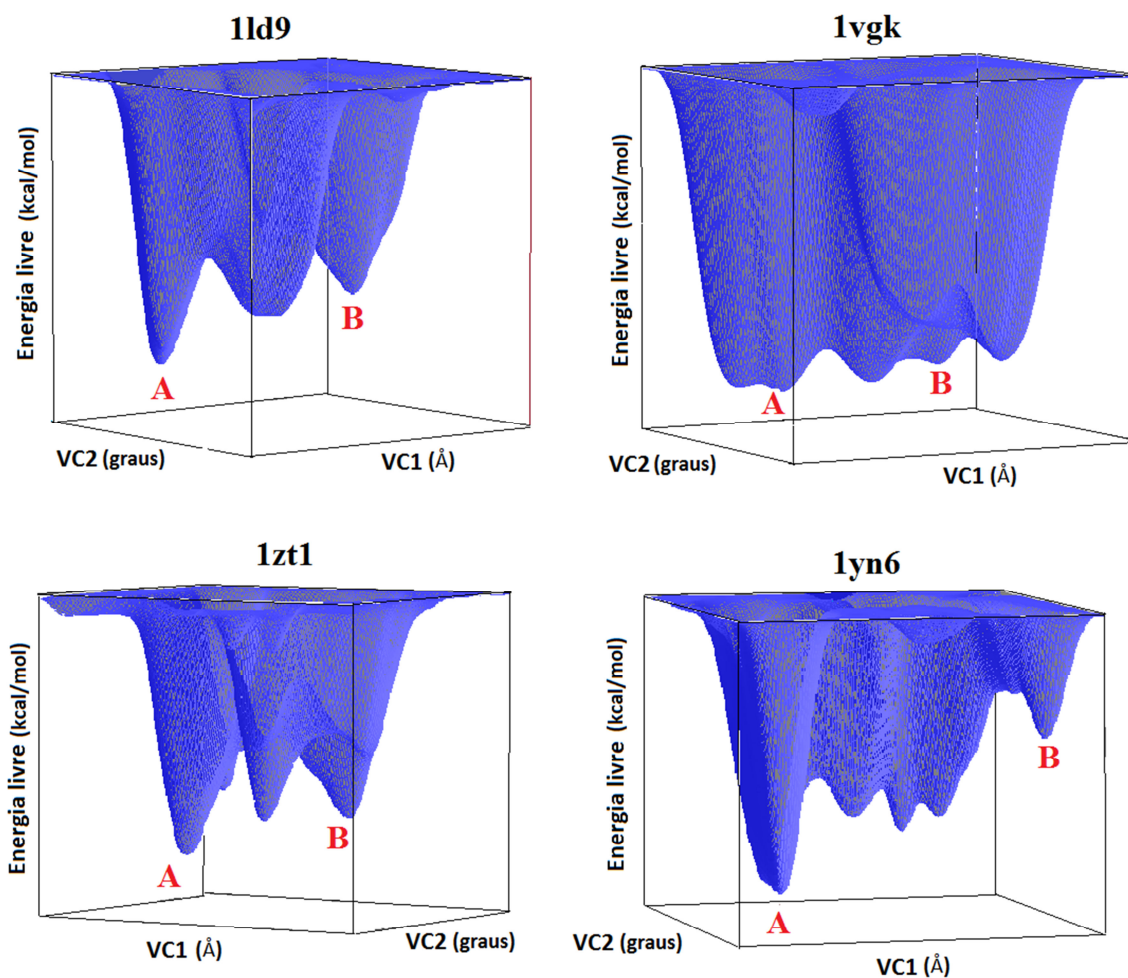


Figura 11: Representação tridimensional das SELs para as estruturas cristalográficas. Na figura são indicados o estado ligado (A) e o estado livre (B) dos peptídeos cristalográficos, onde as variáveis coletivas, VC1 e VC2, são medidas em Ångstrom e graus, respectivamente. A altura da SEL é dada em kcal/mol.

Para comparar a posição obtida no primeiro estado de mínimo encontrado pela MetaD com a posição cristalográfica dos peptídeos em cada complexo, foi calculado o RMSD da cadeia principal dos peptídeos (Tabela 4). Os dados indicam que o valor do RMSD para cada um dos resíduos é menor do que 0,71 Å, onde as exceções são os resíduos localizados na região COOH-terminal do peptídeo, que apresentam uma variação maior de 1,38 Å, 1,22 Å, 1,38 Å e 1,34 Å, nos complexos 1ld9, 1vgk, 1zt1 e 1yn6, respectivamente. Esta variação na região COOH-terminal pode ser explicada pela alta flutuação na conformação dos resíduos localizados na fenda de ligação da proteína H-2 de classe I, para poderem ligar esta região do peptídeo (84). Neste estado de mínimo de energia, podemos afirmar que os peptídeos estão próximos da sua posição cristalográfica obtida dos arquivos do PDB e a variação do RMSD indica somente uma flutuação térmica em torno da posição cristalográfica do peptídeo ligado à fenda da proteína. Portanto, o valor de energia livre correspondente a este estado de estabilidade do peptídeo é utilizado para o cálculo do valor de energia livre de dissociação entre o peptídeo e a proteína H-2 de classe I. Observamos ainda, que esta primeira posição de mínimo de energia na SEL foi encontrada em um tempo de simulação menor que 1,5 ns para os complexos 1ld9, 1vgk e 1zt1. No caso da estrutura 1yn6 essa posição foi encontrada em 3,2 ns.

No segundo estado de mínimo de energia, para nos certificarmos de que o peptídeo atingiu o estado livre da SEL, analisamos o comportamento de algumas propriedades estruturais dos complexos durante as simulações. As propriedades examinadas foram: SASA, o número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e os receptores H-2 e o valor de energia de interação intermolecular entre o peptídeo e a proteína, valores esses que foram calculados a cada passo da simulação de saída dos peptídeos da fenda das proteínas H-2.

Tabela 4: RMSD entre os resíduos dos peptídeos no mínimo de energia na SEL e a posição cristalográfica.

Complexo PDB	RMSD cadeia principal do peptídeo	RMSD cadeia principal por resíduos do peptídeo									
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
1ld9	2,35	0,26 (Y)	0,71 (P)	0,65 (N)	0,4 (V)	0,69 (N)	0,63 (I)	0,19 (H)	0,09 (N)	1,38 (F)	
1vgk	1,65	0,20 (S)	0,10 (Y)	0,04 (V)	0,09 (N)	0,03 (T)	0,54 (N)	0,11 (M)	0,33 (G)	1,22 (L)	
1zt1	3,67	0,56 (F)	0,63 (E)	0,55 (A)	0,67 (N)	0,68 (G)	0,52 (N)	0,20 (L)	1,38 (I)		
1yn6	1,11	0,14 (S)	0,11 (S)	0,08 (L)	0,07 (E)	0,13 (N)	0,07 (F)	0,02 (R)	0,16 (A)	0,08 (Y)	1,34 (V)

Em parênteses se detalham os aminoácidos de cada sequência cristalográfica. Os valores são dados em Ångstrom (Å).

A análise da evolução temporal da SASA de cada um dos complexos cristalográficos (Figura 12) indicou uma tendência de aumento deste valor até sua estabilização, quando os peptídeos atingem o estado computacional livre na solução aquosa e estão fora da fenda dos receptores H-2. Experimentos controle realizados por meio da DM clássica (Figura 12) indicaram que a SASA dos peptídeos se manteve dentro de uma faixa de variação compatível com o estado do peptídeo dentro da fenda da proteína (Tabela 5). Este fato reforça a abordagem da MetaD em deslocar o peptídeo para fora do sítio de ligação da proteína.

Em relação ao número de ligações de hidrogênio formadas durante o processo de saída e ao valor da energia de interação intermolecular calculada entre os peptídeos e proteína (considerando os componentes de energia eletrostática e de van der Waals), (Figuras 13 e 14) observamos que ambas tendem para zero no final da simulação, confirmando a completa saída do peptídeo da fenda. Deste modo, o peptídeo deixa de interagir com a proteína e se estabelece fora dela. Nos experimentos de controle, executados por meio da DM clássica, os resultados indicaram que todos os peptídeos se mantiveram na fenda da proteína, com seus valores de energia de interação e número de ligações de hidrogênio mantidos dentro de uma faixa de variação compatível com o estado do peptídeo dentro da fenda dos receptores H-2 (Tabela 5), para os complexos 1ld9, 1vgk, 1zt1 e 1yn6 (Figuras 13 e 14).

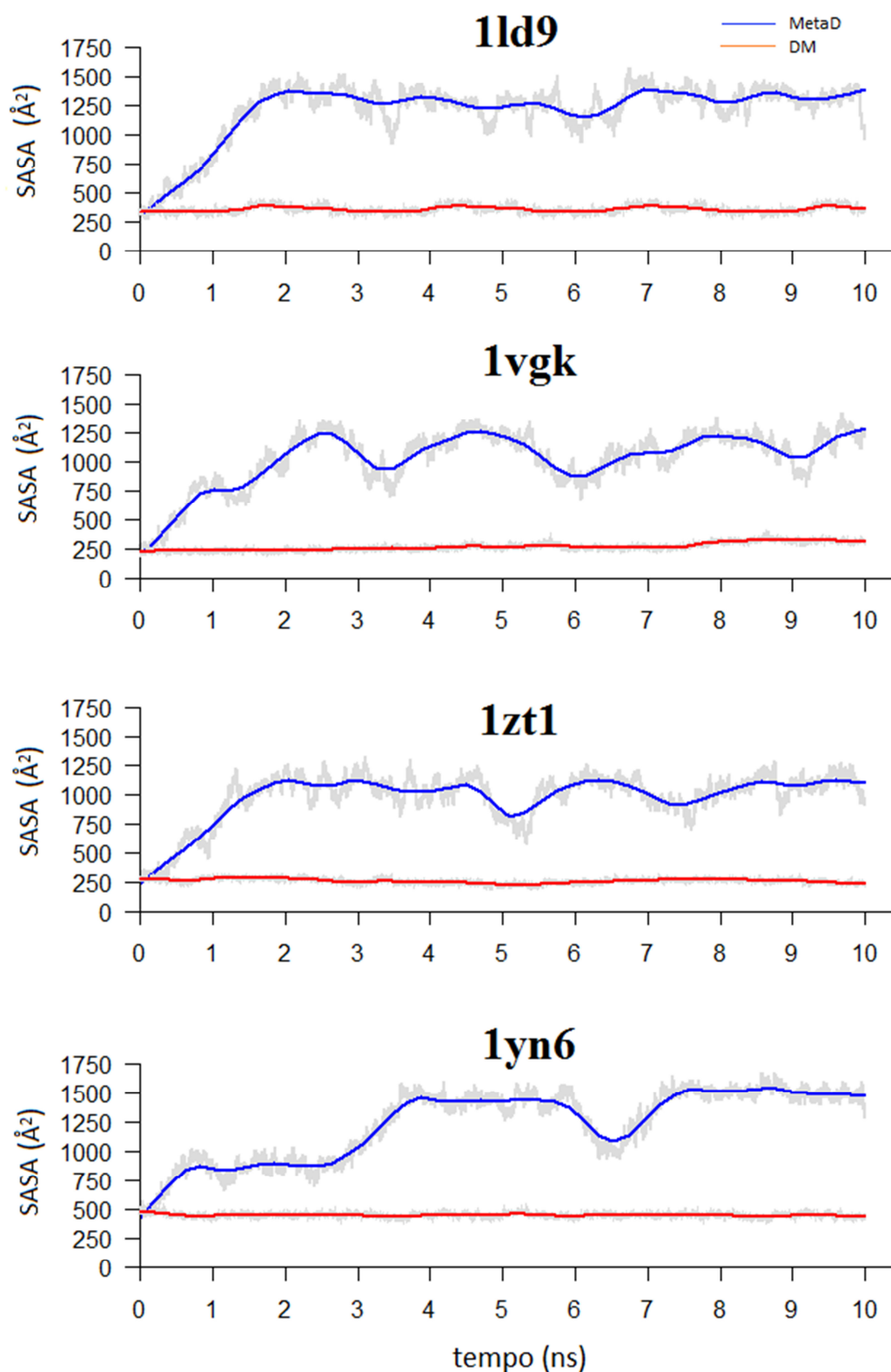


Figura 12: Evolução temporal da SASA dos peptídeos nos complexos cristalográficos. A evolução da SASA foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical os valores da SASA estão Ångstrom² (Å²).

Tabela 5: Variação SASA, energia de interação intermolecular e N° de ligações de hidrogênio nos ensaios da DM clássica

Identificador do Complexo	SASA		Energia de interação intermolecular		N° de ligações de hidrogênio	
	cv**	Média (Å²)	cv**	Média (kcal/mol)	cv**	Média (n)
1*	9,55%	351,54	7,91%	-296,31	27,01%	10
2*	9,76%	259,85	6,69%	-429,58	27,18%	16
3*	8,83%	260,52	4,92%	-344,62	19,79%	16
4*	9,74%	448,85	5,93%	-557,82	20,47%	15
5	8,97%	275,23	7,22%	-221,07	23,53%	15
6	9,22%	267,91	5,67%	-398,72	19,40%	17
7	8,43%	281,20	8,32%	-399,02	23,30%	10
8a	9,42%	278,23	7,98%	-262,39	19,72%	10
9a	8,38%	270,22	7,56%	-552,70	22,87%	10
8b	9,03%	250,06	8,59%	-249,34	23,04%	10
9b	8,89%	280,51	7,25%	-372,04	20,19%	13
10	8,91%	271,01	9,73%	-119,94	21,07%	11
11	9,53%	599,37	8,97%	-243,81	18,19%	9

(*) Complexos PDB: 1=1ld9; 2=1vgk; 3=1zt1 e 4=1yn6

(**) Coeficiente de variação: $cv = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \cdot 100$

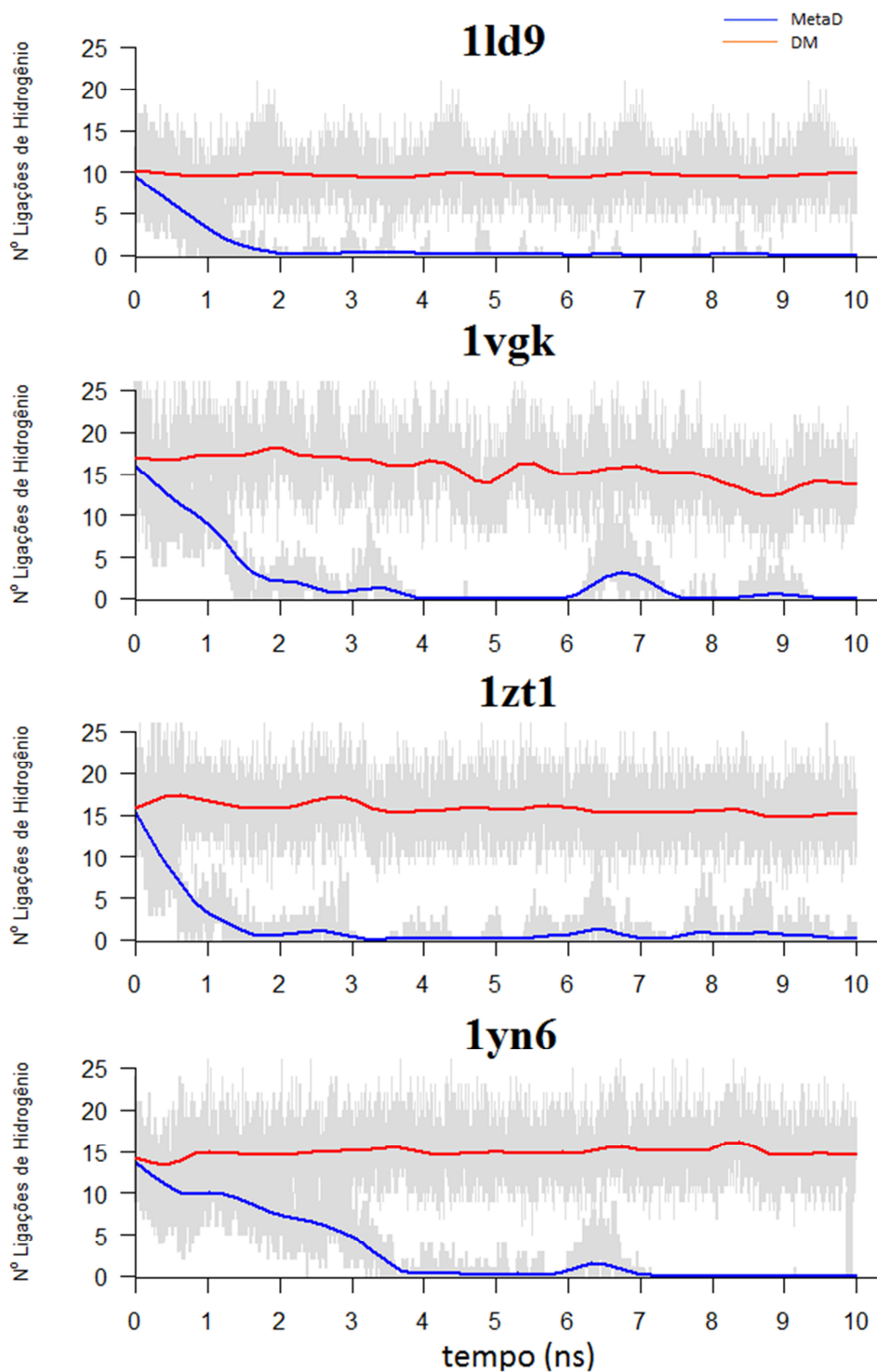


Figura 13: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e a fenda da proteína H-2 de classe I para os complexos cristalográficos. A evolução do número de ligações de hidrogênio foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical do número de ligações de hidrogênio (n).

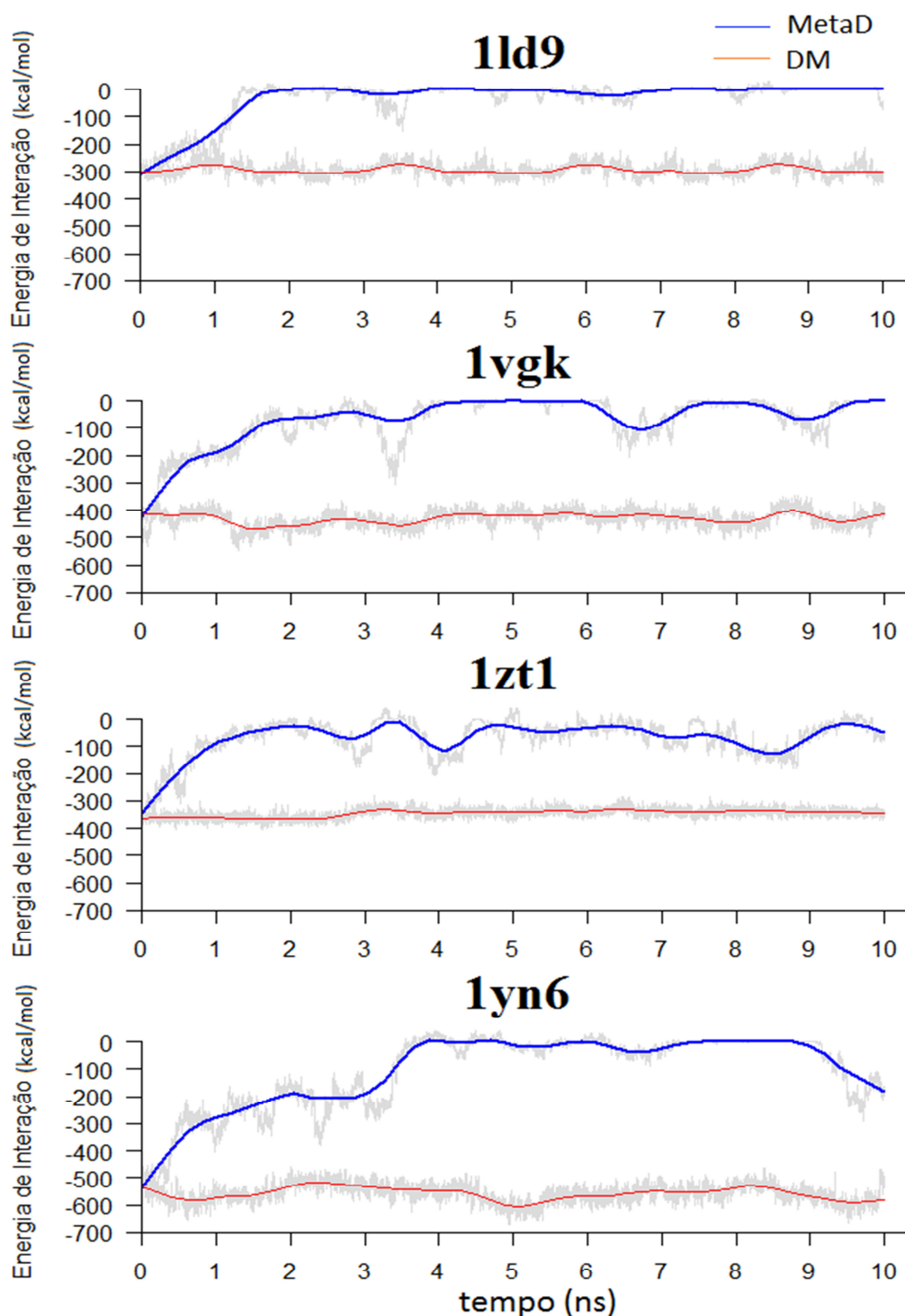


Figura 14: Evolução temporal da energia de ligação entre os peptídeos e a fenda da proteína H-2 de classe I para os complexos cristalográficos. A evolução da energia de ligação foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). Esses dados levam em consideração os componentes de energia eletrostática e van der Waals. A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical a energia de ligação em quilocaloria por mol (kcal/mol).

4.2.2 Cálculo da Energia Livre de Dissociação dos Peptídeos as Proteínas H-2 de Classe I

Nossos dados indicaram que é essencialmente a evolução no tempo da variável VC1 que descreve a saída do peptídeo do sítio de ligação do H-2. Deste modo, para que pudéssemos realizar uma análise mais detalhada do comportamento da VC1, produzimos as representações unidimensionais da SEL (Figura 15). As superfícies foram projetadas sobre o plano energia vs. distância (VC1), para as quatro estruturas cristalográficas do conjunto de validação. Estas projeções foram obtidas através da integração do fator de Boltzmann sobre a variável coletiva VC2, e a energia de dissociação ($\Delta G_{\text{dissociação}}$) foi calculada pela diferença entre os valores de energia obtidos nos estados do peptídeo ligado e livre da proteína H-2. Os resultados do cálculo dos valores de $\Delta G_{\text{dissociação}}$ através das simulações por MetaD foram comparados com aqueles obtidos do servidor PDBePISA (Tabela 6)

O valor de RMSD considerando a diferença entre os valores calculados pelos ensaios da MetaD e os obtidos do servidor PDBePISA foi de 1,1 kcal/mol. Esta estimativa está dentro da faixa de variação esperada para o erro associado ao cálculo de energia livre de dissociação para complexos de proteínas do PDB (85).

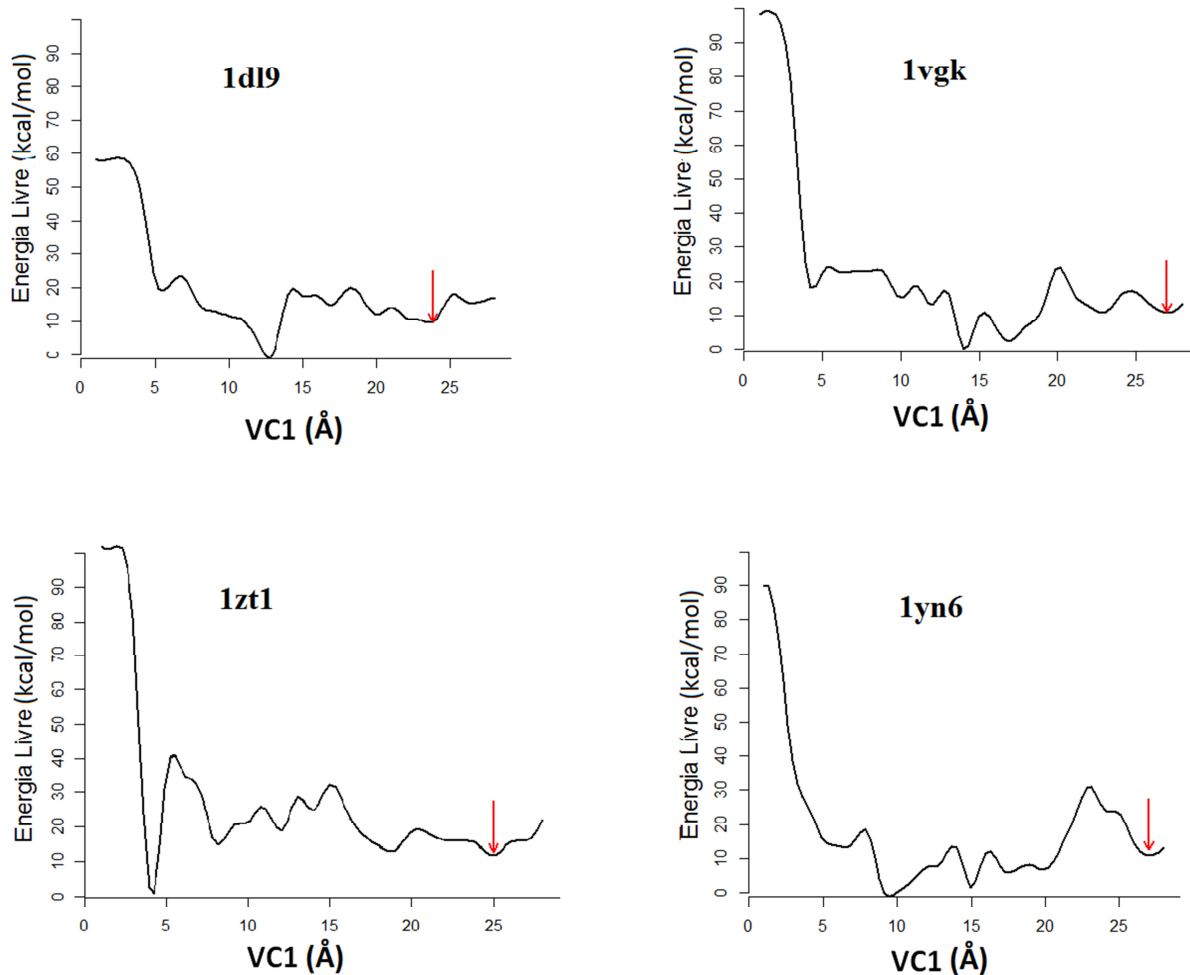


Figura 15: Projeção unidimensional das SELs dos complexos H-2/peptídeos. A escala do eixo horizontal indica os valores VC1 em Ângstrom (Å) e a escala do eixo vertical os valores de energia livre em quilocaloria por mol (kcal/mol). As posições do segundo mínimo da SEL para os diferentes haplótipos (1dl9, 1vgk, 1zt1 e 1yn6) são indicadas na figura (↓).

Tabela 6: Energia livre de dissociação para os complexos do conjunto de teste

Identificador do conjunto de teste	Complexo PDB	$\Delta G_{\text{dissociação}}$ PISA*	$\Delta G_{\text{dissociação}}$ MetaD*	$\Delta\Delta G_{\text{dissociação}}$
1	1ld9	8,0	9,1	1,1
2	1vgk	10,2	10,8	0,6
3	1zt1	10,3	11,6	1,3
4	1yn6	12,0	10,7	1,3

* Unidades em kcal/mol.

4.3 Aplicação da Metadinâmica para os Peptídeos Preditos Derivados da Cyspep

Nesta etapa do projeto, nossos esforços se concentraram em aplicar a abordagem de MetaD, validada ao longo deste trabalho, para avaliar o modo de ligação dos epítomos oriundos da *cyspep*. A hipótese de que os peptídeos derivados da *cyspep* são fatores importantes durante a infecção no hospedeiro murino para *L. (L.) amazonensis* vem sendo fortalecida (31, 38, 39). No entanto, ainda se faz necessário investigar os detalhes da ligação destes epítomos com as proteínas H-2, descrevendo o modo de interação em escala molecular dessas ligações, o que pode colaborar na descoberta de padrões de interações possivelmente relacionados com a de resposta imune desencadeada pela *L. (L.) amazonensis* durante a infecção experimental. Desta forma, foi aplicada a MetaD para investigar a interação dos epítomos da *cyspep* complexados computacionalmente com as proteínas H-2 de classe I.

No entanto, é importante ressaltar que a utilização de uma abordagem de simulação de um evento raro, como a saída do peptídeo da fenda da proteína H-2 de classe I, adiciona maior conhecimento a respeito dos fenômenos estruturais que ocorrem ao longo do tempo de saída do peptídeo. Estes eventos raros acontecem em escala de tempo, onde não é possível observar seus aspectos moleculares utilizando meios mais tradicionais de observação, como ressonância magnética, cristalografia de raio X, ensaios em SPR, etc. Os resultados da observação estrutural das simulações são mostrados ao longo desta seção, incluindo ainda a indicação da existência de uma distância mínima para que os peptídeos possam interagir com a fenda dos receptores H-2 de classe I.

4.3.1 Construção da SEL para os Complexos H-2/Peptídeos Derivados da Cyspep

As estruturas correspondentes aos complexos H-2/peptídeos preditos derivados da *cyspep* foram obtidas através do uso de dois diferentes haplótipos como base para realização das mutações. Com o uso destas estruturas fizemos as devidas mutações de modo a obtermos a sequência de aminoácidos dos peptídeos derivados da *cyspep* a serem estudados em nosso trabalho. A estrutura do arquivo do PDB com código 1yn6 (haplótipo D^b) foi modificada em sua sequência de aminoácidos do peptídeo para receber as sequências dos peptídeos derivados da

cyspep e dar origem aos complexos 5, 6, 7, 8a e 9a (Tabela 1). Já a estrutura do arquivo do PDB com código 1ld9 (haplótipo L^d) foi modificada para dar origem às estruturas 8b, 9b, 10 e 11 (Tabela 1).

As estruturas resultantes das mutações foram submetidas ao servidor Rossetta FlexPepDock (86) para refinamento. Esta etapa foi crucial para o processo de simulação destes complexos, pois em nossos testes iniciais, sem este passo de refinamento, não foi possível reconstruir a SEL de forma adequada.

O servidor Rossetta FlexPepDock aplica um protocolo de alta precisão para o *docking* do peptídeo na proteína. O objetivo do uso deste servidor foi determinar as possíveis poses do peptídeo dentro da fenda dos receptores H-2. Através da aplicação deste protocolo, foi possível submeter as estruturas iniciais dos complexos, obtidos após as mutações, a um conjunto de procedimentos de otimização de modo a gerarmos um modelo inicial mais adequado e assim calcular os valores de energia livre da SEL.

O algoritmo do servidor executou duzentas simulações independentes (usando o método de Monte Carlo), sendo cem delas aplicando um passo de pré-otimização em baixa precisão (onde as cadeias laterais do peptídeo são representadas como centroides esféricos de tamanho variável) com uma posterior execução em alta precisão (onde é permitida a completa flexibilidade da cadeia principal e da cadeia lateral dos peptídeos). As outras cem simulações foram executadas diretamente em alta precisão. Foram criados os dez melhores modelos de cada complexo, classificados de acordo com a função de energia do software Rosetta (87). O modelo com melhor classificação de cada conjunto foi escolhido como a configuração inicial para os nossos ensaios de simulação (Figuras 16 e 17).

A análise das imagens na Figura 16 nos permite sugerir que os peptídeos dos complexos 5, 6, 7, 8a e 9a podem interagir na região $\alpha 1/\alpha 2$ da estrutura H-2 D^b de maneira análoga ao cristal utilizado como molde (1yn6). De forma análoga, a análise das imagens na Figura 17 também nos permite sugerir que os peptídeos dos complexos 8b, 9b, 10 e 11 podem interagir na região $\alpha 1/\alpha 2$ da estrutura H-2 L^d de maneira análoga ao cristal utilizado como molde (1ld9).

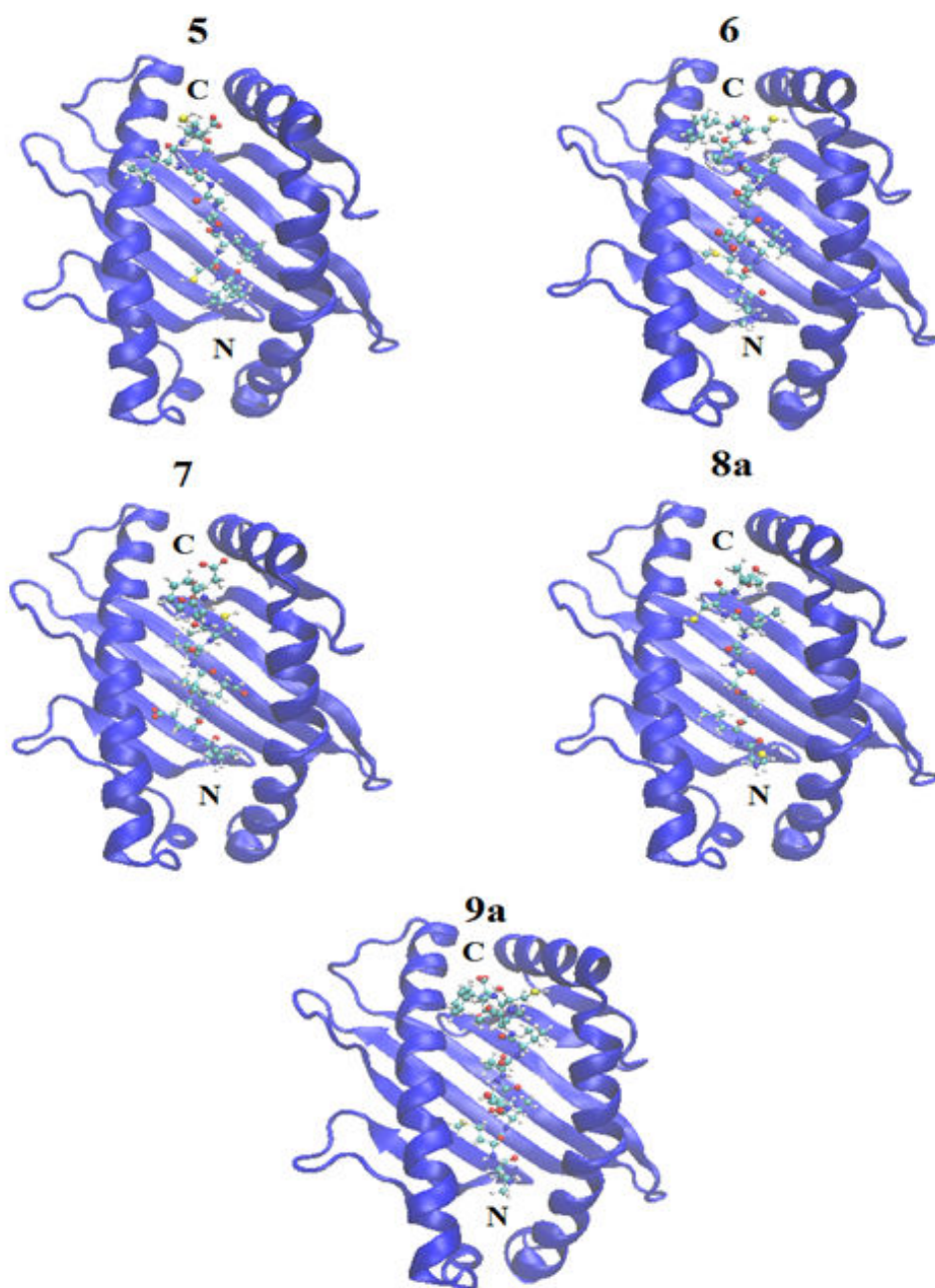


Figura 16: Modelo tridimensional dos heterodímeros formados pelos peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 D^b. O modelo teórico dos heterodímeros foi obtido por mutação, seguido de refinamento das estruturas pelo servidor Rossetta FlexPepDock. As cadeias alfa (azul) da proteína H-2 de classe I estão representadas em *new cartoon* e o peptídeo ligado à fenda, em *CPK*. São destacadas as regiões NH₂-terminal (N) e COOH-terminal (C) dos peptídeos.

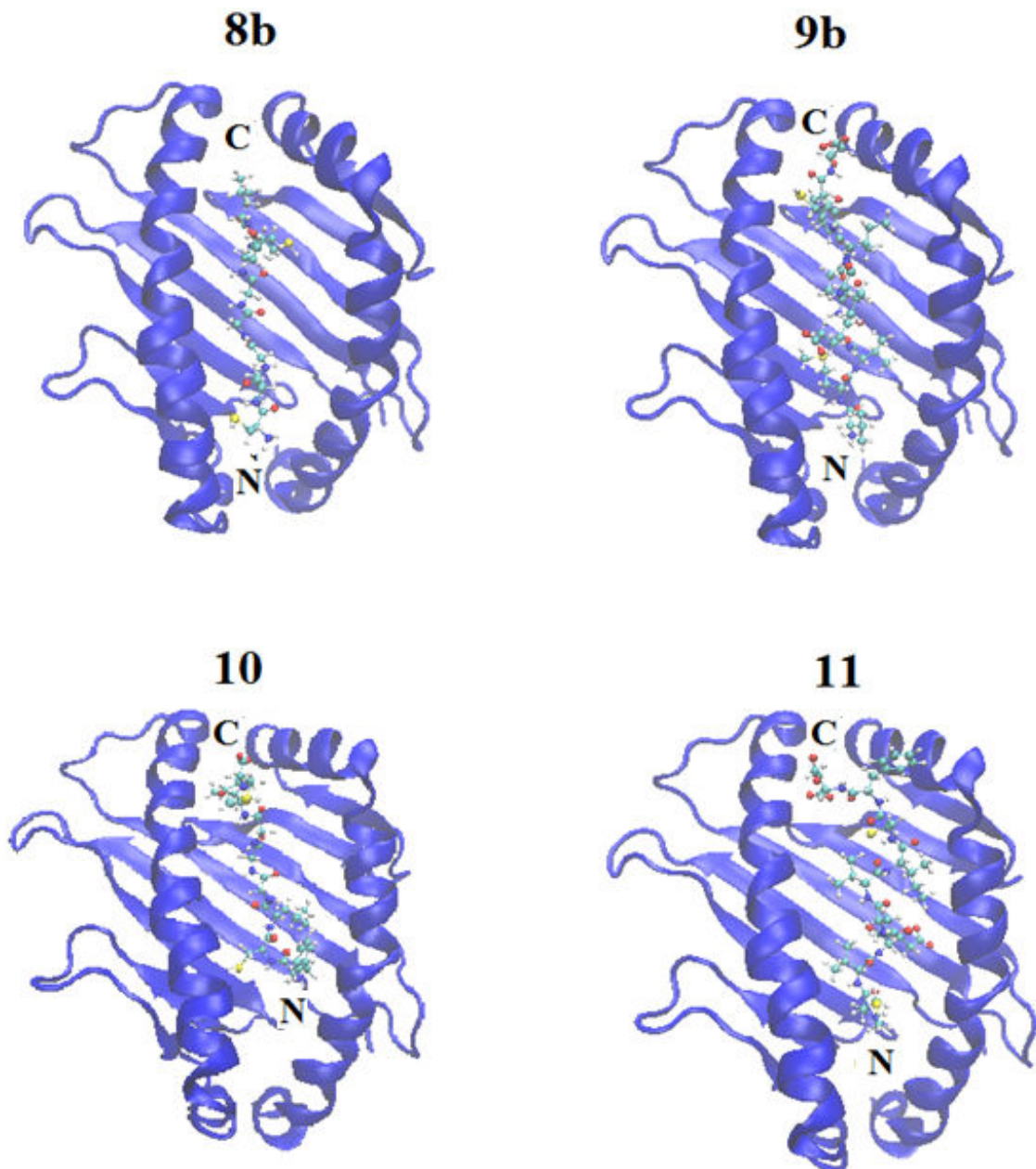


Figura 17: Modelo tridimensional dos heterodímeros formados pelos peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 L^d. O modelo teórico dos heterodímeros foi obtido por mutação, seguido de refinamento pelo servidor Rossetta FlexPepDock. As cadeias alfa (azul) da proteína H-2 de classe I estão representadas em *new cartoon* e o peptídeo ligado à fenda, em *CPK*. São destacadas as regiões NH₂-terminal e COOH-terminal dos peptídeos.

Assim como no conjunto de validação, as SELs foram construídas em função das variáveis coletivas VC1 e VC2. Os mapas das SELs para complexos H-2 de classe I/peptídeos derivados da *cyspep*, para os haplótipos D^b e L^d, foram calculados quando os peptídeos estavam completamente fora da fenda da proteína (Figuras 18 e 19). Utilizamos o mesmo critério estabelecido durante o procedimento de validação para definirmos os tempos de corte das simulações da MetaD (Tabela 3).

No seu primeiro estado de mínimo de energia na SEL, o peptídeo está ligado à fenda do H-2, o que corresponde à sua posição geométrica inicial obtida a partir dos resultados do servidor Rossetta FlexPepDock. No segundo estado, o peptídeo está no estado livre na solução aquosa.

Na continuidade deste estudo, a caracterização da saída do peptídeo do sítio de ligação, definido pelos domínios $\alpha 1/\alpha 2$ da proteína H-2, foi analisada a partir do comportamento da SASA, o número de ligações de hidrogênio e o valor de energia de interação intermolecular entre peptídeo e proteína.

Desta forma nossos dados indicaram que há um crescimento dos valores da SASA até a sua estabilização, quando os peptídeos atingiram o seu estado não-ligado à proteína, que corresponde ao estado do peptídeo livre na solução aquosa. (Figuras 20 e 21).

O número de ligações de hidrogênio formadas durante o processo de saída dos peptídeos da fenda e o valor da energia de interação intermolecular tenderam para zero, ao final das simulações por MetaD (Figuras 22, 23, 24 e 25), confirmando a completa saída do peptídeo.

Experimentos semelhantes também foram realizados por DM clássica e indicaram que todos os peptídeos se mantiveram na fenda da proteína, uma vez que não houve flutuação significativa dos valores SASA, energia de interação intermolecular e número de ligações de hidrogênio (Tabela 5). As variações para os valores de SASA e energia de interação intermolecular ficaram dentro da faixa de variação de 10% da média dos valores obtidos neste intervalo. Já a flutuação do número de ligações de hidrogênio esteve dentro do limite de 30% da média observada, o que indica a manutenção dessas ligações, durante as simulações da DM clássica, sem perda da interação do peptídeo com a proteína.

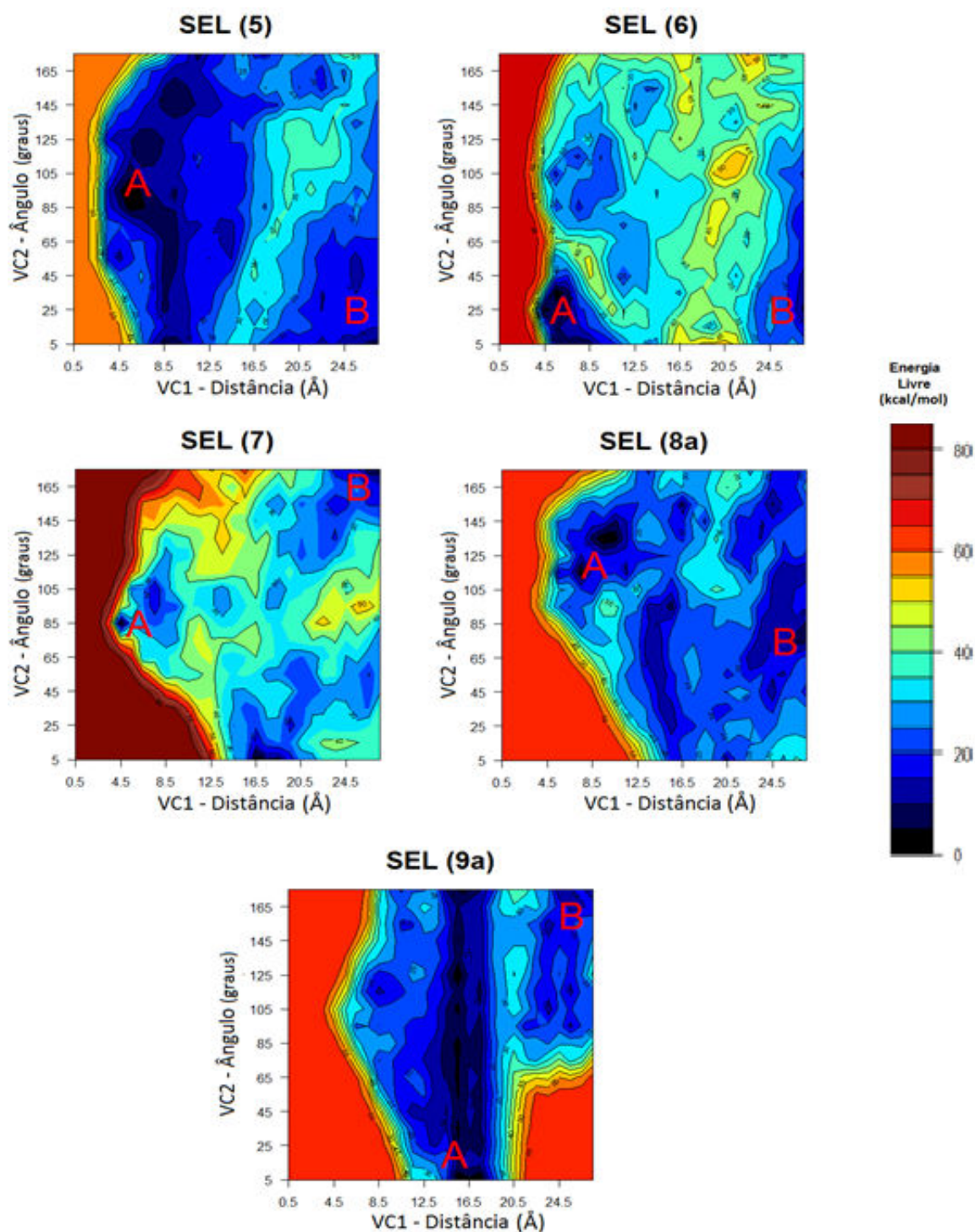


Figura 18: Representação bidimensional da SEL para os complexos formados pelos peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 D^b. Na figura são indicados o estado ligado (A) e o estado livre (B) dos peptídeos. Na escala cromática à direita dos mapas cada cor indica uma variação de 5 kcal/mol. Os mapas foram construídos em intervalos da distância em Ångstrom para a VC1 e em intervalos de graus para a VC2, representando a energia associada a cada par ordenado de valores dessas VCs

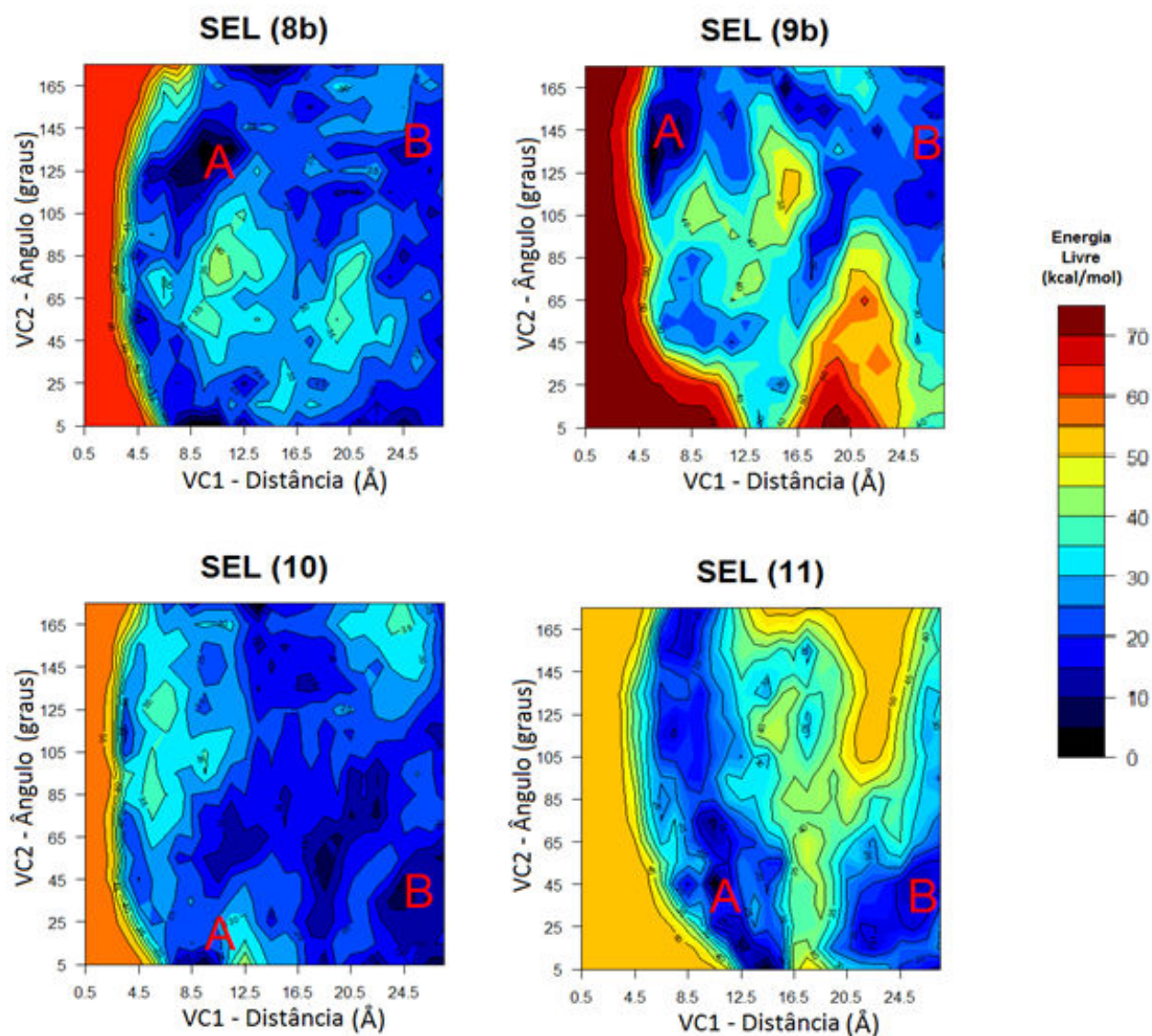


Figura 19: Representação bidimensional da SEL para os complexos formados pelos peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 L^d. Na figura são indicados o estado ligado (A) e o estado livre (B) dos peptídeos. Na escala cromática à direita dos mapas cada cor indica uma variação de 5 kcal/mol. Os mapas foram construídos em intervalos da distância em Ångstrom para a VC1 e em intervalos de graus para a VC2, representando a energia associada a cada par ordenado de valores dessas VCs

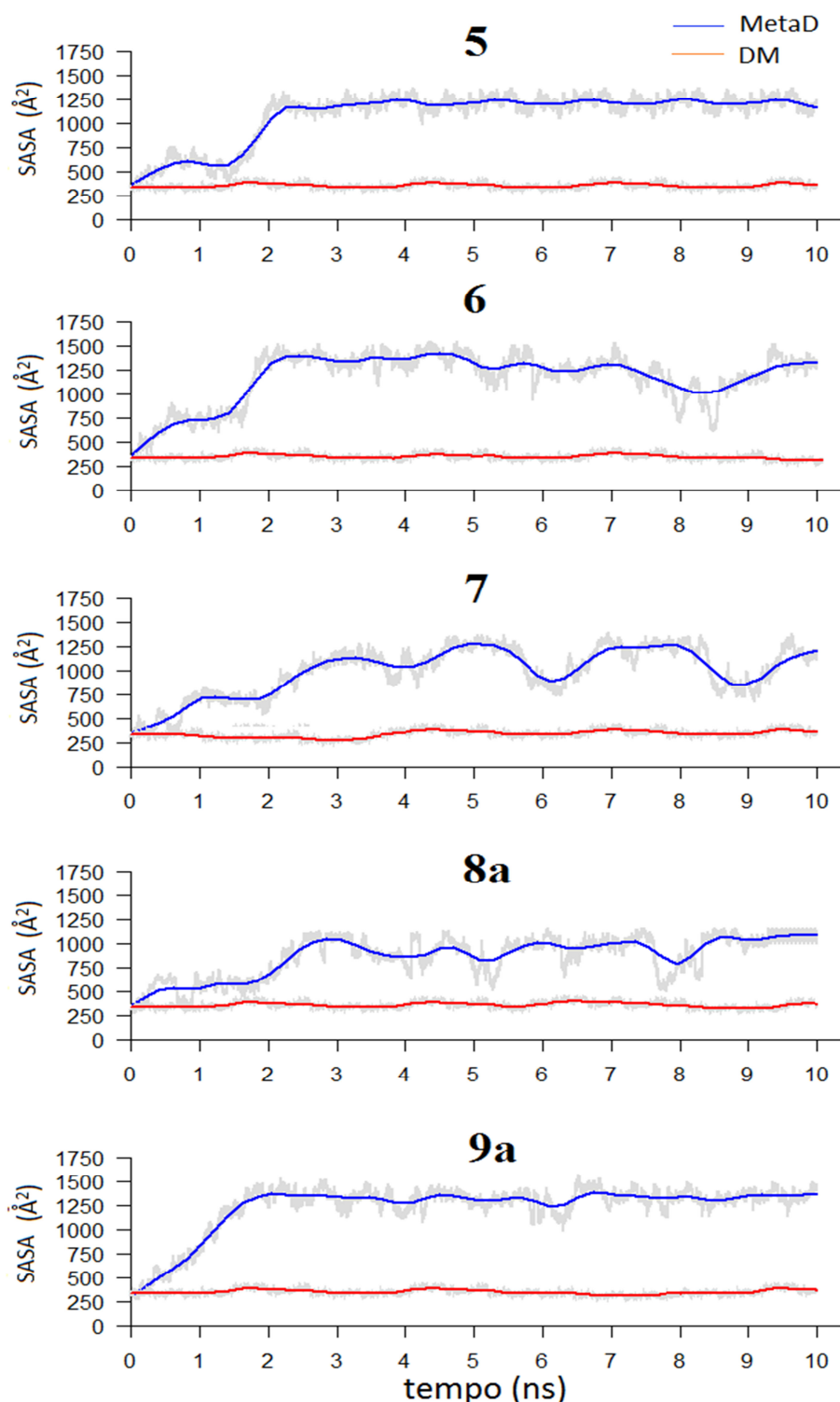


Figura 20: Evolução temporal da SASA dos peptídeos da *cyspep* nos heterodímeros formados com a estrutura H-2 D^b. A evolução da SASA foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical os valores da SASA estão Ångstrom² (Å²).

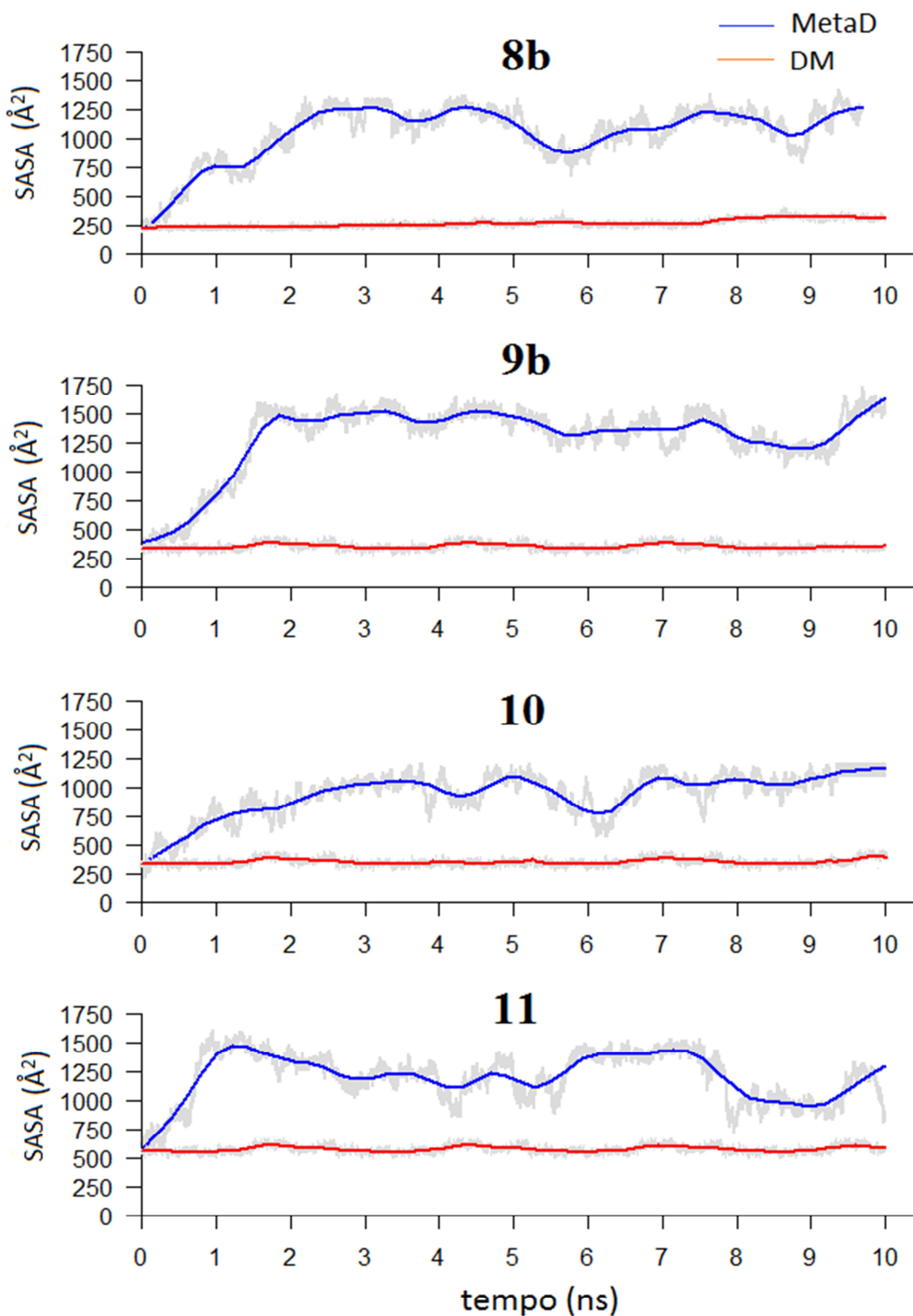


Figura 21: Evolução temporal da SASA dos peptídeos da *cyspep* nos heterodímeros formados com a estrutura H-2 L^d. A evolução da SASA foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical os valores da SASA estão Ångstrom² (Å²).

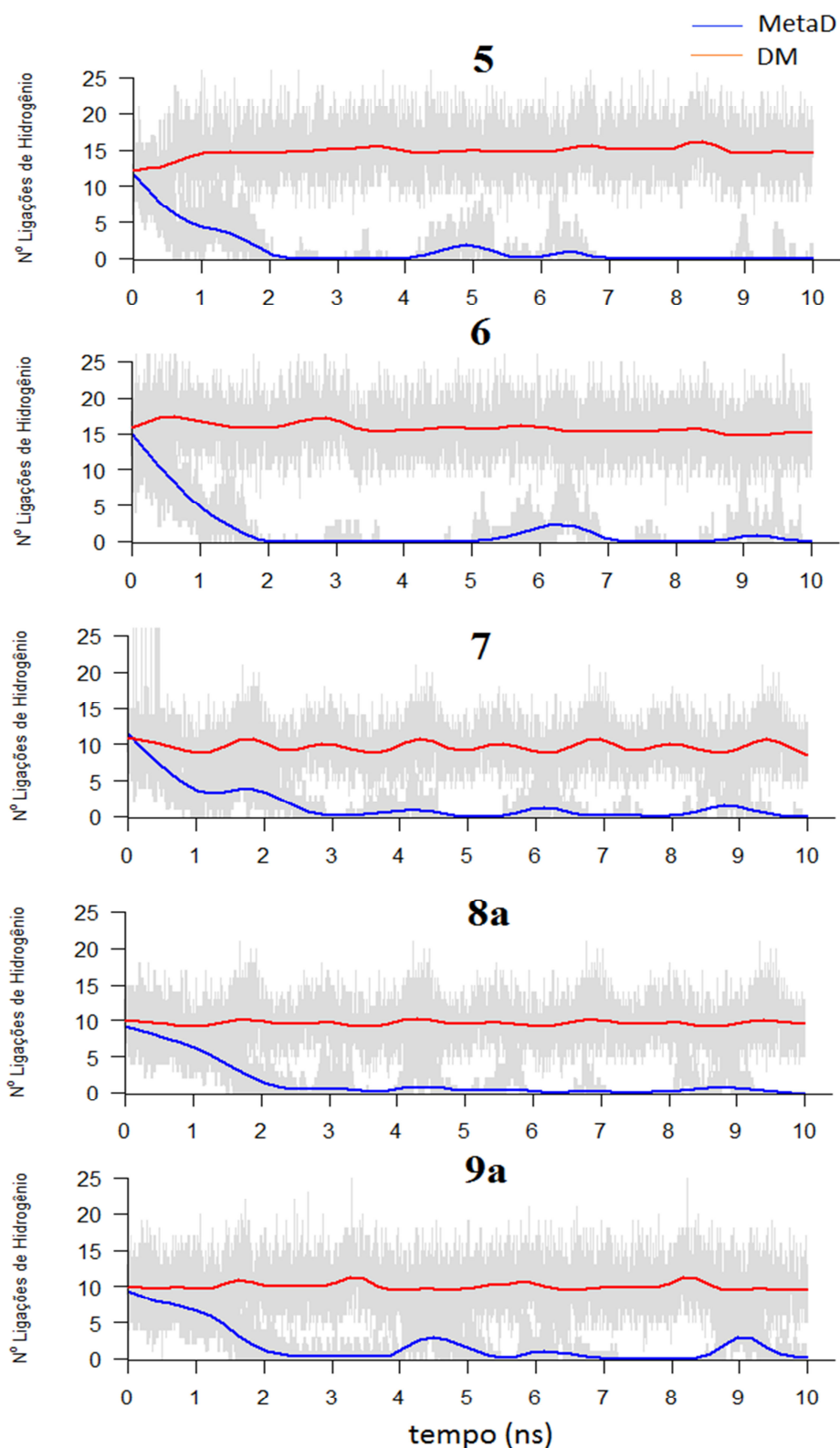


Figura 22: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 D^b. A evolução do número de ligações de hidrogênio foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical do número de ligações de hidrogênio.

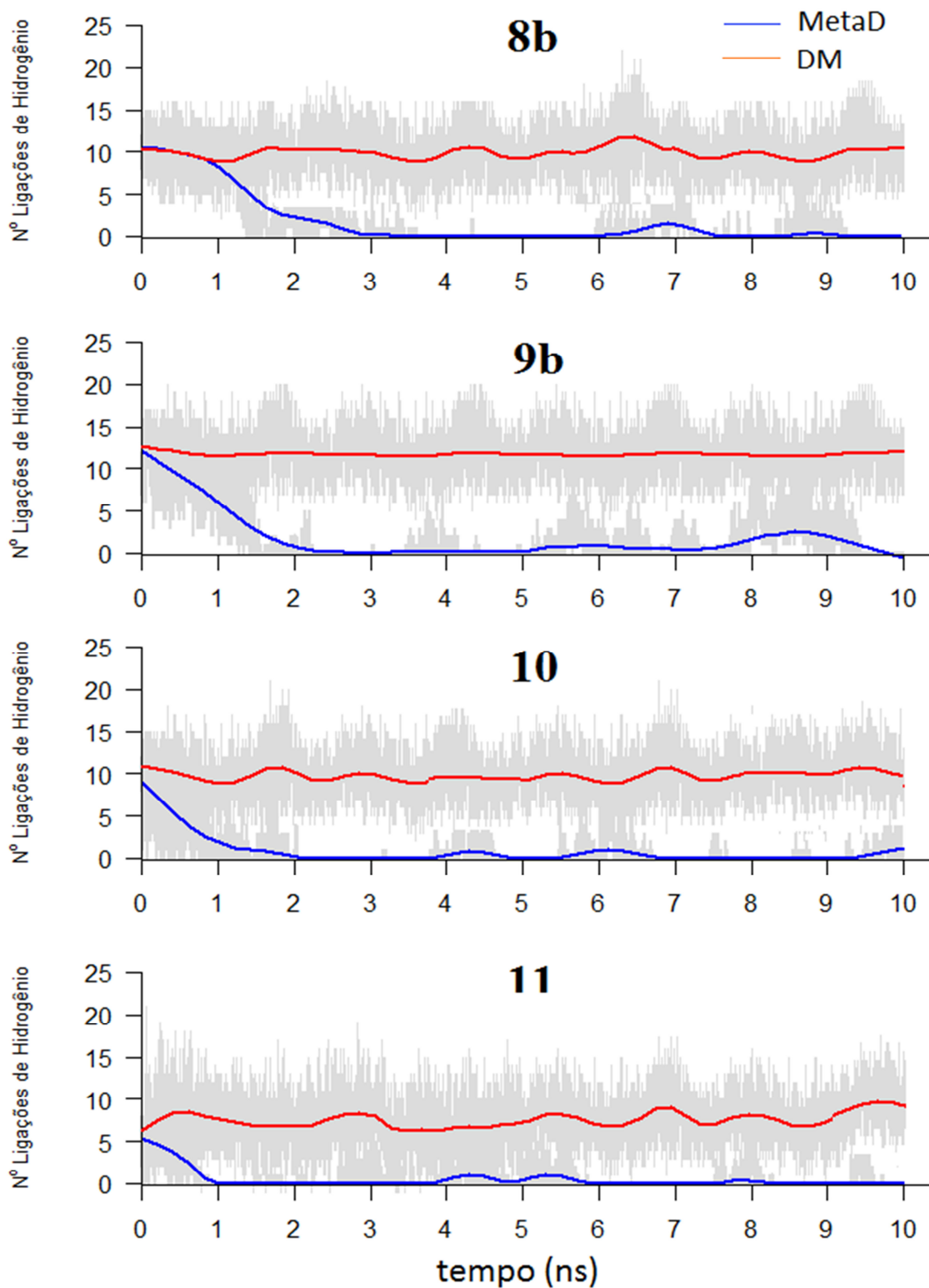


Figura 23: Evolução temporal do número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 L^d. A evolução do número de ligações de hidrogênio foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical do número de ligações de hidrogênio.

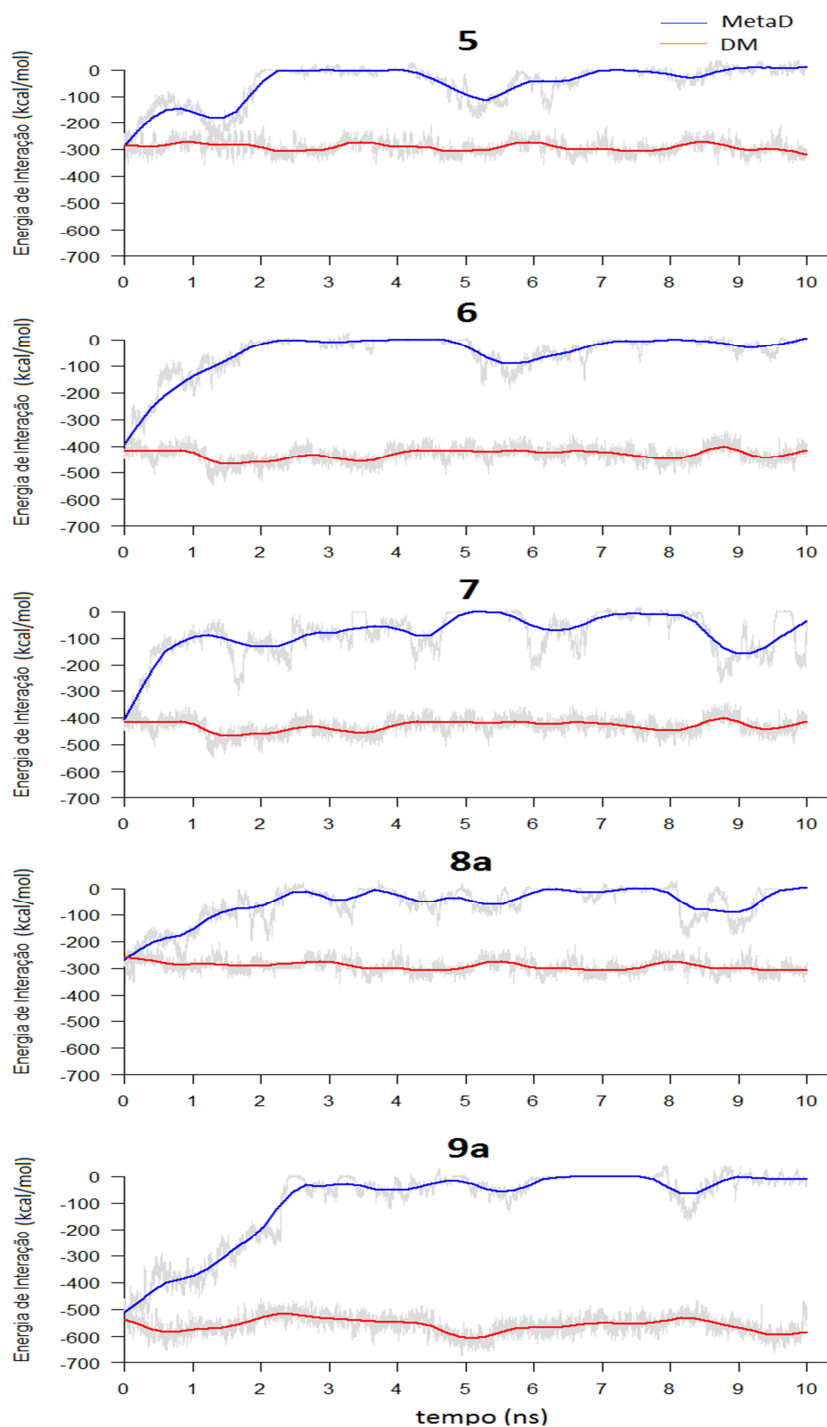


Figura 24: Evolução temporal da energia de ligação, entre os peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 D^b. A evolução da energia de ligação foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). Esses dados levam em consideração os componentes de energia eletrostática e van der Waals. A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical a energia de ligação em quilocaloria por mol (kcal/mol).

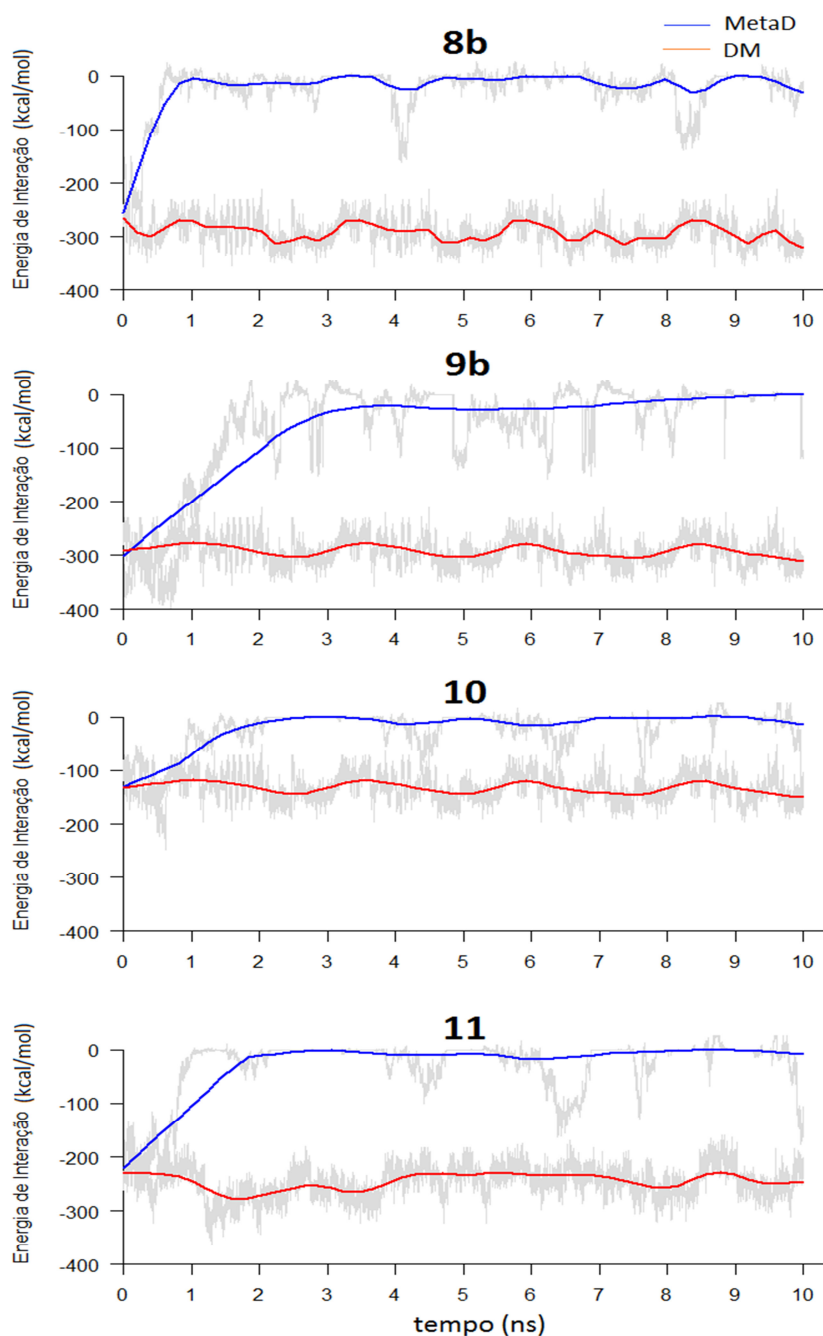


Figura 25: Evolução temporal da energia de ligação, entre os peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 L^d. A evolução da energia de ligação foi analisada por MetaD (—) e por DM clássica (—). Esses dados levam em consideração os componentes de energia eletrostática e van der Waals. A escala do eixo horizontal indica a variação do tempo em ns e a escala do eixo vertical a energia de ligação em quilocaloria por mol (kcal/mol).

4.3.2 Cálculo da Energia Livre de Dissociação entre os Peptídeos Derivados da Cyspep e a Proteína H-2 de Classe I

Para evitar influência do processo de *recrossing*, consideramos o momento de corte das simulações da MetaD quando a localização do mínimo global nos mapas de energia livre atingiu um valor de coordenada VC1 ≥ 20 Å (Tabela 3), como definido nos ensaios de validação. Estes mapas de energia livre foram utilizados para o cálculo da energia livre de dissociação.

A evolução no tempo da variável VC1 descreve a saída do peptídeo do sítio de ligação do H-2 e foi avaliada projetando a SEL sobre o plano energia vs. distância (VC1). De modo análogo ao que foi feito para o conjunto de validação (Figuras 26 e 27).

Na continuidade dessas análises, os resultados do cálculo dos valores de $\Delta G_{\text{dissociação}}$ por simulações por MetaD foram comparados com aqueles obtidos do servidor PDBePISA e com os obtidos pelos ensaios de SPR (39), para os peptídeos sintéticos experimentalmente testados (Tabela 7). Os nossos dados indicaram o valor de RMSD 1,2 kcal/mol, na comparação dos ensaios da MetaD com os valores obtidos do servidor PDBePISA; e RMSD 2,7 kcal/mol, na comparação com os dados de SPR.

De maneira geral, ambos os valores de RMSD estão próximos da faixa de variação esperada para o erro associado ao cálculo de energia livre de dissociação (85). Estes dados nos permitem afirmar que os ensaios de MetaD foram capazes de reproduzir o valor $\Delta G_{\text{dissociação}}$ para cada um dos complexos testados.

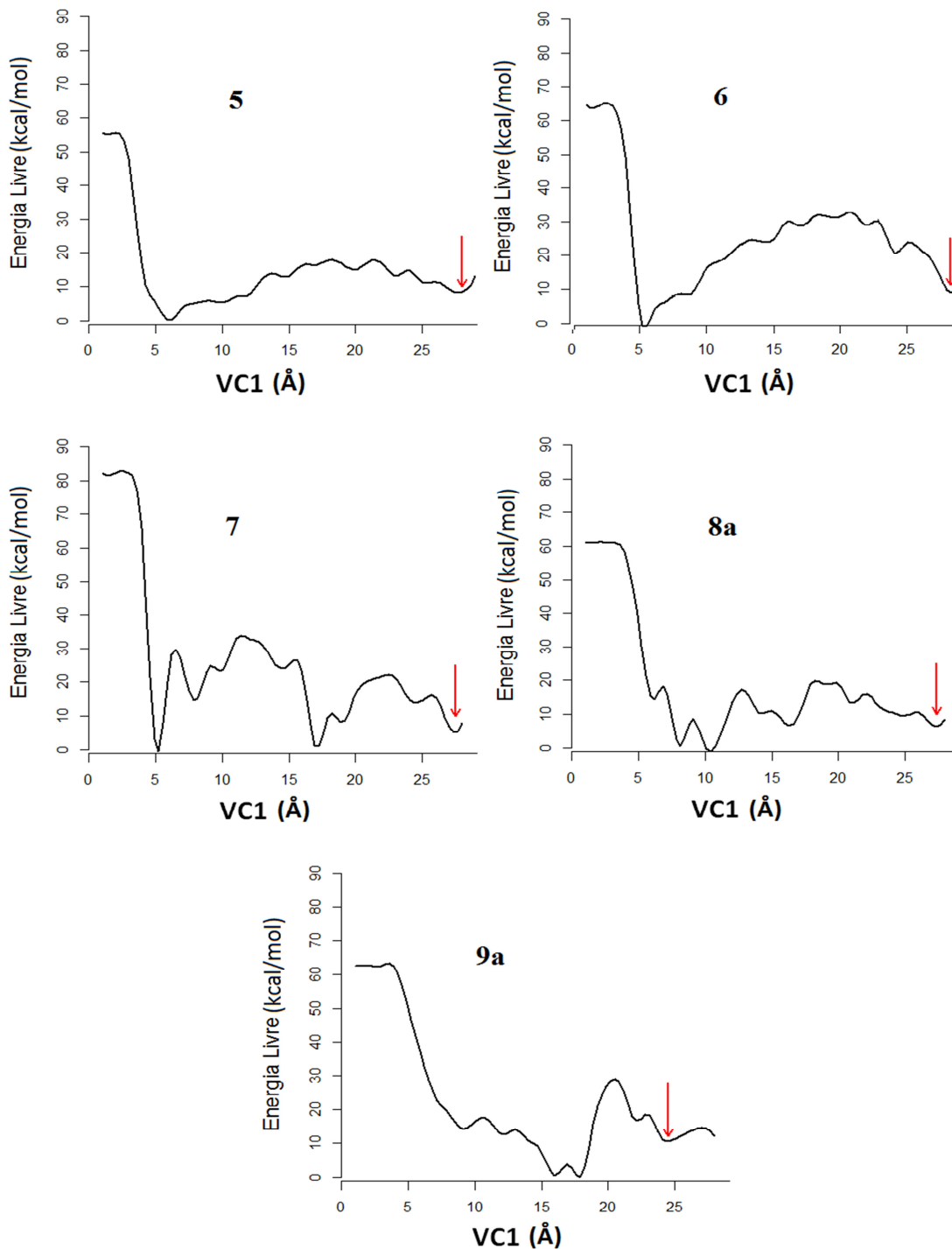


Figura 26: Projeção unidimensional das SEL dos heterodímeros formados pelos peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 D^b. A escala do eixo horizontal indica os valores VC1 em Ångstrom (Å) e a escala do eixo vertical os valores de energia livre em quilocaloria por mol (kcal/mol). As posições do segundo mínimo da SEL para as diferentes estruturas (5, 6, 7, 8a e 9a) são indicadas na figura (↓).

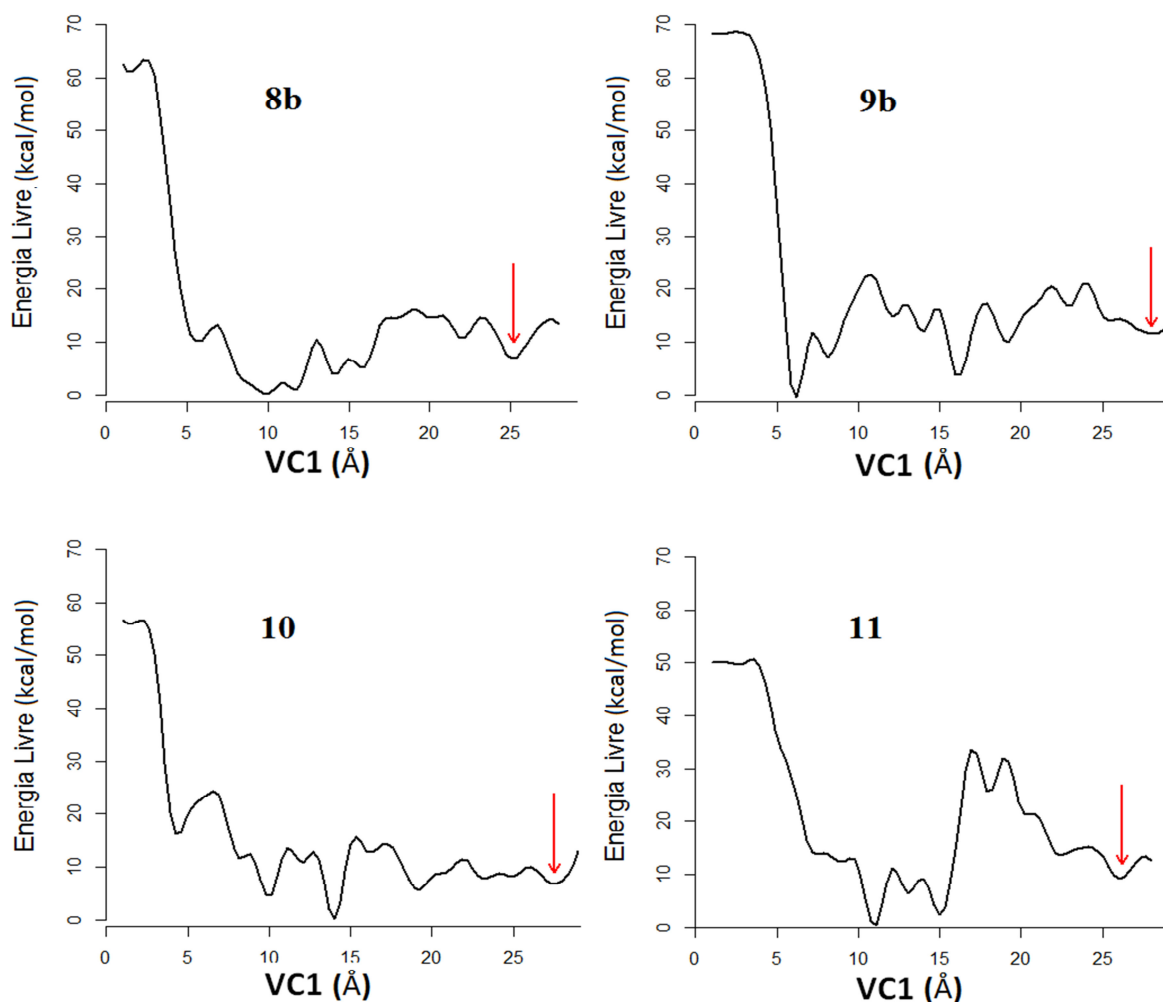


Figura 27: Projeção unidimensional das SEL dos heterodímeros formados pelos peptídeos da *cyspep* e a estrutura H-2 L^d. A escala do eixo horizontal indica os valores VC1 em Ângstrom (Å) e a escala do eixo vertical os valores de energia livre em quilocaloria por mol (kcal/mol). As posições do segundo mínimo da SEL para as diferentes estruturas (8b, 9b, 10 e 11) são indicadas na figura (↓).

Tabela 7: Comparação das energias livres de dissociação para os complexos H-2 peptídeos derivados da *cyspep*.

Identificador dos complexos	Haplótipo	Sequência de aa	$\Delta_{\text{dissociação}}$ PISA	$\Delta_{\text{dissociação}}$ MetaD	$\Delta_{\text{dissociação}}$ SPR
5	D ^b	FCLGGGLCL	9,9	8,3	4,3
6	D ^b	VMVEQVICF	10,0	8,6	7,2
7	D ^b	VEQVICFD	5,4	7,0	8,0
8a	D ^b	CLGGGLCL	5,2	7,1	5,2
9a	D ^b	VMVEQVICFD	10,6	11,2	6,4
8b	L ^d	CLGGGLCL	7,4	7,0	8,3
9b	L ^d	VMVEQVICFD	10,0	11,6	8,2
10	L ^d	FCLGGGLC	8,2	7,4	5,3
11	L ^d	MVEQVICFD	8,7	9,1	7,8

4.4 Interações Moleculares nos Complexos Peptídeos Preditos da *Cyspep* e as Proteínas H-2 de Classe I

Dentre as interações que se estabelecem entre os resíduos de aminoácidos da fenda dos receptores H-2 e os peptídeos imunogênicos, destaca-se o papel das ligações de hidrogênio para manter o peptídeo ligado à fenda de forma estável nos domínios $\alpha 1/\alpha 2$ (43, 45, 84). Além das ligações de hidrogênio, as interações intermoleculares nos complexos H-2/peptídeo também contribuem para a estabilidade e manutenção desta ligação (88). Considerando ainda que a estabilidade na formação dos complexos H-2/peptídeos afeta significativamente a intensidade da resposta imune conduzida pelas células T CD8 (89, 90), propusemos estudar o modo como ocorreram tais ligações durante a saída dos peptídeos da fenda do H-2.

Abordagens de mapeamento de epítomos por simulação computacional e ensaios biológicos indicaram que peptídeos da *cyspep* apresentam capacidade de induzir a proliferação celular e a expressão de citocinas relacionadas às respostas imune do tipo 1 e 2. Resultados de *docking* molecular indicaram que o modo de interação entre as proteínas H-2 e os epítomos pode estar relacionado com os efeitos imunomoduladores sobre as citocinas, apontando para padrões de interação peptídeos-MHC associados a padrões de indução da expressão de citocinas (15, 37).

O desenho experimental deste estudo previu a aplicação de procedimentos para acelerar a visitação de estados de mínimos de energia durante as simulações das interações moleculares dos complexos H-2/peptídeos, para explorar o processo de saída dos peptídeos no sítio de ligação da proteína H-2. Nossa hipótese de trabalho é que as simulações da DM por MetaD podem contribuir para o entendimento das prováveis características de interação e para a análise de padrões de interações, tornando possível a visualização de arquétipos dos epítomos que estão associados a determinados tipos de reação do sistema imune. Desta forma, nossos ensaios indicaram a importância de alguns resíduos durante o processo de dissociação dos peptídeos da proteína H-2, determinando as suas principais interações e prevendo a duração das ligações de hidrogênio e das interações intermoleculares que ocorrem entre eles, como forma de quantificar a importância de cada uma delas.

4.4.1 Ligações de Hidrogênio entre os Peptídeos Derivados da *Cyspep* e as Proteínas H-2 de Classe I

A DM tem sido utilizada como ferramenta complementar às técnicas experimentais, como cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear, para a observação das interações moleculares entre proteínas (91, 92). Durante o processo de saída dos peptídeos da fenda da proteína H-2 de classe I, avaliamos a formação de ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos destes peptídeos e da proteína.

Nos ensaios de dissociação dos complexos realizados, foi possível constatar que as ligações de hidrogênio vão se desfazendo gradativamente e os tempos de formação dessas ligações foram assumidos como indicativo da intensidade da ligação dos resíduos do peptídeo à fenda da proteína, significando que os resíduos de aminoácidos dos peptídeos que necessitam de um percentual de tempo maior para se desligarem da fenda estão mais fortemente ligados à proteína H-2.

Uma vez que constatamos que o tempo de saída do peptídeo da fenda da proteína foi diferente para cada complexo estudado, para haver equivalência na comparação entre os tempos de formação das ligações de hidrogênio, consideramos o valor relativo do tempo de formação dessas ligações. Desta forma, estes valores foram calculados como uma fração do tempo de saída do peptídeo (Tabelas 8 e 9).

De um modo geral, para ambos haplótipos, constatamos que a região NH₂-terminal do peptídeo manteve ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos do sitio de ligação da proteína H-2 (Tyr7, Tyr59, Tyr159 e Tyr171), classicamente descrito (43). Esta informação foi parcialmente confirmada para os complexos 6, 7, 8a, 9a e 10. Além disso, a análise das ligações de hidrogênio para os resíduos desta região dos peptídeos mostrou que outros resíduos da fenda formaram ligações de hidrogênio de maior duração durante os ensaios de dissociação por MetaD: Glu9(5), Glu63(6), Glu58(7), Glu61(7), Glu63(7), Glu63(8a), Glu163(8a), Glu63(9a), Glu163(8b), Glu58(9b), Glu163(9b), Gln70(10) e Tyr99(10) (Tabelas 8 e 9), onde os valores em parêntesis indicam os complexos das ligações. Estes resultados sugerem que tais resíduos contribuem na manutenção da estabilidade do peptídeo na fenda da proteína H-2, e esta estabilidade da ligação dos peptídeos à proteína é considerada uma característica essencial para que epítomos de linfócitos T sejam capazes de induzir uma resposta celular contra a infecção (89, 90).

Do ponto de vista da proteína H-2 D^b como receptor, vale mencionar o papel do resíduo Glu63. De acordo com as análises feitas, este resíduo formou ligações de hidrogênio com o grupo amina da região NH₂ terminal do peptídeo, com percentuais de tempo de duração consideráveis. Para o complexo 6 esse percentual foi de 24,6%, para o 8a foi de 22,0% e para o complexo 9a de 25,8%. Nos complexos 8a e 9a, vemos ainda que o resíduo Glu63 forma ligações de hidrogênio com outros resíduos do peptídeo, elevando os percentuais de tempo de duração das ligações de hidrogênio para 42,8 e 50,9%, respectivamente. Estes resultados apontam para a importância do resíduo Glu63 para a ligação dos peptídeos à fenda da proteína. Esta informação está em acordo com outros trabalhos publicados, onde esse resíduo foi apontado como uma importante âncora da proteína do H-2 D^b (93) e desempenhando também papel importante na interação entre peptídeos derivados da *cyspep* com a proteína H-2 K^d e H-2 D^b, relacionado com a indução de um perfil de resposta imune celular. A participação de resíduos como este, formando ligações de hidrogênio mais estáveis, como mostrado neste trabalho, também foi relacionada com a indução da expressão de padrões de citocinas envolvidas na infecção experimental de camundongos por *L. (L.) amazonensis* (38).

Os dados também indicaram que para os peptídeos dos complexos 5 e 7, o resíduo Glu63 não formou ligações de hidrogênio de longa duração com a proteína, durante a simulação por MetaD. No entanto, outros resíduos de ácidos glutâmicos (Glu9, Glu58, Glu61 e o próprio Glu63) ainda parecem ter papel importante para manter a estabilidade da ligação dos complexos, pois formaram ligações de hidrogênio de maior duração com o peptídeo.

Para o haplótipo H-2 L^d, as principais ligações de hidrogênio identificadas foram observadas entre os grupos amina da região NH₂-terminal dos peptídeos dos complexos 8b, 9b e 10 e resíduos da fenda da proteína H-2, sendo os resíduos Glu163 e Gln70 os mais importantes. Observamos ainda que para o complexo 8b a duração desta ligação de hidrogênio com o resíduo Glu163 foi de 52,0% do tempo considerado para da simulação da saída o peptídeo, o que indica uma forte âncora para a ligação do peptídeo nesta região.

Para os peptídeos que interagem com o haplótipo H-2 L^d, os resíduos da região COOH-terminal do peptídeo estiveram propensos a formar ligações de hidrogênio por um tempo maior entre suas cadeias laterais e os resíduos da fenda do H-2. Para o complexo 11, estas ligações de hidrogênio se mantiveram por 50,7% do tempo de simulação da saída do peptídeo. Este fato confirma a existência de

uma forte âncora de ligação dos peptídeos na sua região COOH-terminal (43) com o receptor H-2 L^d, o que não foi confirmado para os complexos com o receptor H-2 D^b. No entanto, para o complexo 11, essas ligações foram observadas somente com a região COOH-terminal, sem formar ligações com outras regiões do peptídeo, de modo que fosse possível estabelecer uma segunda região de ligação com a fenda da proteína H-2. Nossos dados mostraram que o peptídeo do complexo 11 foi aquele que saiu da fenda em um menor tempo de simulação (1,5 ns) e, além disso, foi o que não apresentou propriedade de induzir linfócitos T CD8⁺ *in vitro* (39), sugerindo o fraco envolvimento deste durante a resposta imune celular induzida pelo parasito.

Tabela 8: Percentuais de tempo das ligações de hidrogênio ocorridas entre os peptídeos e as proteínas H-2 D^b.

Haplótipo D ^b									
Identificador dos complexos	Grupo amina do peptídeo			Grupo carboxila do peptídeo			Cadeia lateral do peptídeo		
	Resíduo do peptídeo	Resíduo do H-2	% tempo formação das ligações de hidrogênio	Resíduo do peptídeo	Resíduo do H-2	% tempo de formação das ligações de hidrogênio	Resíduo do peptídeo	Resíduo do H-2	% tempo de formação das ligações de hidrogênio
5	F1	E9	32,9	F1	S24	1,5			
	F1	Q70	1,2						
6	V1	Y7	13,1	E4	H155	3,3	E4	R62	4,3
	V1	E63	24,6				E4	K66	10,7
	V1	Y171	3,2				E4	Y159	3,9
7	V1	Y7	3,2	V1	Y159	4,1	E2	Y7	1,3
	V1	E58	5,6	E2	K66	2,7	E2	Y22	2,1
	V1	E61	4,5	E2	Y159	3,2	E2	S24	9,6
	V1	E63	8,0				E2	Y45	14,4
							E2	K66	10,8
8a	C1	E63	22,0	C1	Y159	21,8	C1	Y7	2,2
	C1	E163	14,9						
	L2	E63	20,8						
9a	V1	Y7	2,3	V1	Y159	7,0	E4	R62	11,4
	V1	Y59	3,0				E4	K66	1,8
	V1	E63	25,8				E4	H155	0,5
	M2	E63	16,1						
	V3	E63	9,0						

Tabela 9: Percentuais de tempo das ligações de hidrogênio ocorridas entre os peptídeos e as proteínas H-2 L^d.

Haplótipo L ^d												
Identificador dos complexos	Grupo amina do peptídeo			Grupo carboxila do peptídeo			Cadeia lateral do peptídeo					
	Resíduo do peptídeo	Resíduo do H-2	% tempo formação das ligações de hidrogênio	Resíduo do peptídeo	Resíduo do H-2	% tempo de formação das ligações de hidrogênio	Resíduo do peptídeo	Resíduo do H-2	% tempo de formação das ligações de hidrogênio			
8b	C1	E163	52,0				L8	Y146	28,3			
							L8	W147	3,1			
9b	V1	E58	2,5				D10	Y84	12,3			
	V1	E163	18,8				D10	R145	4,8			
10	F1	Y7	5,9				C8	K146	10,8			
										Q70	31,4	
										Y99	2,8	
11	F1	Y171	5,2				D9	W73	1,8			
										D9	T80	3,6
										D9	K146	50,7

4.4.2 Energia de Interação Intermolecular entre os Peptídeos Derivados da *Cyspep* e as Proteínas H-2 de Classe I

A energia de interação intermolecular estabelecida entre os resíduos dos peptídeos e da proteína tem sido considerada para avaliar a estabilidade da ligação dos peptídeos à fenda dos receptores H-2 (94), o que também foi explorado no presente estudo. Desta forma, nos ensaios de MetaD foram calculadas as interações intermoleculares dos peptídeos derivados da *cyspep* com os resíduos de aminoácidos da fenda das proteínas H-2 (Figura 28).

Para avaliar a contribuição da energia de interação intermolecular na estabilidade do peptídeo na fenda, utilizamos o conceito de meia-vida. A meia-vida da energia de interação intermolecular dos resíduos do peptídeo com os resíduos da proteína foi definida como o tempo necessário para que a energia de interação intermolecular se reduza à metade do seu valor inicial. Deste modo, o segundo período de meia-vida corresponde ao tempo necessário para que o valor inicial da energia de interação se reduza a $\frac{1}{4}$ da energia inicial. Os dados da simulação de MetaD ressaltando os períodos de meia-vida podem ser observados na Figura 28.

Para o receptor H-2 D^b, os resíduos dos peptídeos atingiram o segundo período de meia-vida antes de 40% do tempo de saída, exceto para alguns resíduos dos peptídeos nos complexos 8a e 9a. Para os resíduos P1, P2 e P3 do peptídeo no complexo 9a, vale observar que estes atingiram o segundo período de meia-vida em mais de 60% do tempo de saída da fenda (84,3; 60,3 e 61,9% do tempo, para os resíduos P1, P2 e P3, respectivamente). No complexo 8a, os percentuais foram menos expressivos apresentando valores de 52,5 e 44,4%, respectivamente, para os resíduos P1 e P2.

Para o haplótipo H-2 L^d, os resíduos do peptídeo no complexo 9b tiveram um decaimento de sua energia de interação inicial distribuída de forma mais homogênea, com exceção do aminoácido na posição P4. Para o complexo 11, os aminoácidos das posições P2, P5 e P9 mostraram relevantes interações com o receptor H-2.

Para todos os complexos, as mais fortes interações intermoleculares foram observadas nas extremidades dos peptídeos (NH₂ e COOH terminais). No caso dos peptídeos nos complexos 9a e 9b, os dados indicaram que o aminoácido na posição P1 (Val1) teve uma segunda meia-vida maior, de 84,3 e 66,6%, respectivamente, indicando que este resíduo de aminoácido se manteve mais tempo ligado à proteína. Este fato foi mais evidente na ligação com o receptor do haplótipo H-2 D^b do que

para o haplótipo H-2 L^d, onde observamos a contribuição de outros resíduos na interação com o receptor. Os peptídeos destes dois complexos são os únicos que apresentam 10 aminoácidos em sua sequência, indicando uma relação do tamanho do peptídeo com a meia-vida da energia de interação intermolecular. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a parte central de peptídeos mais longos seja projetada para fora da fenda de modo a acomodar de forma mais favorável as regiões NH₂ e COOH-terminal do peptídeo nos sulcos de ligação (95).

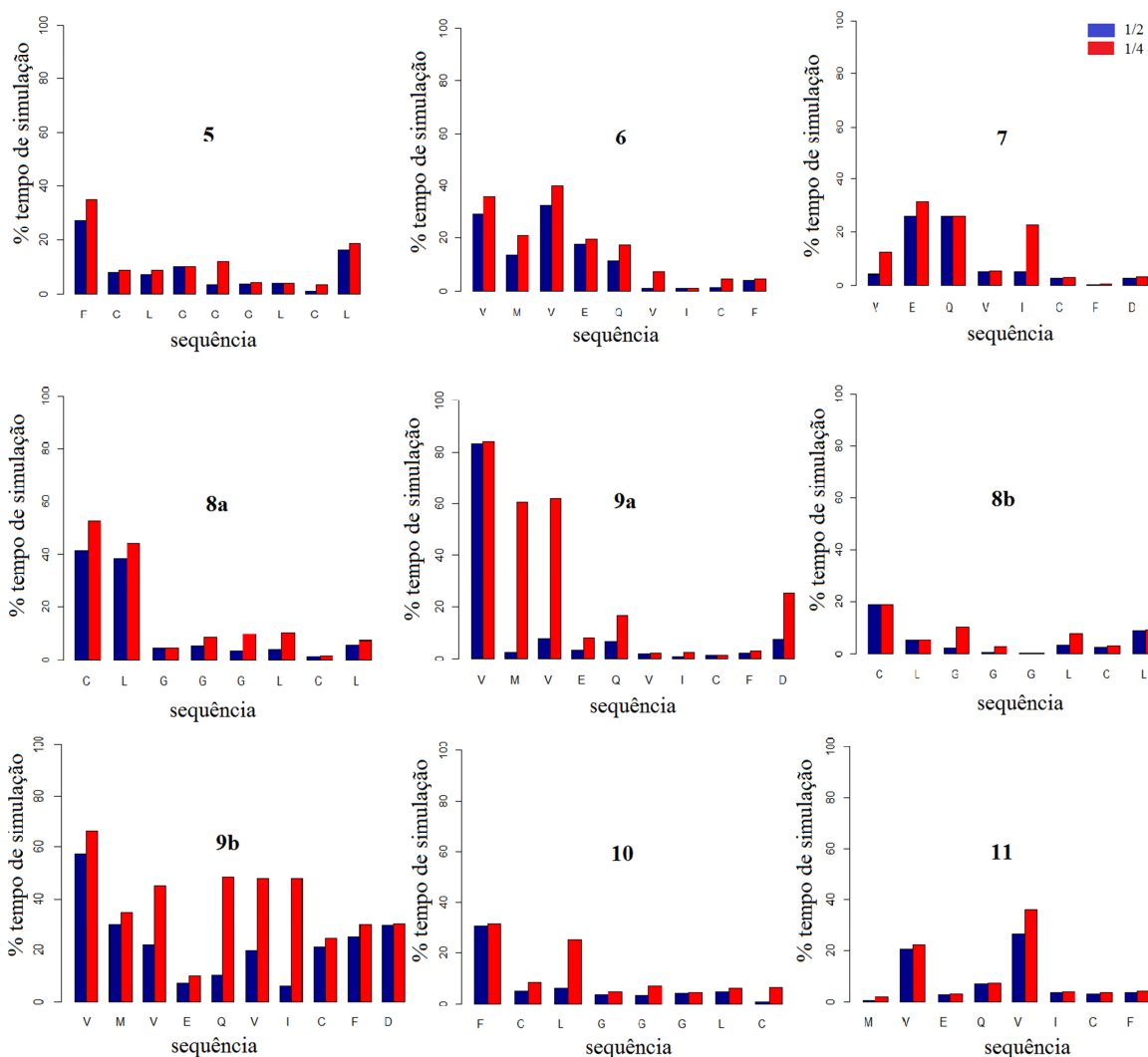


Figura 28: Proporção da energia de interação intermolecular entre os resíduos dos complexos para os haplótipos D^b e L^d. Na figura, as barras em azul mostram os percentuais de tempo relativos ao decaimento de uma meia-vida da energia de interação intermolecular (decaimento de 50% da energia de interação inicial), enquanto que as barras em vermelho mostram o decaimento relativo ao segundo período de meia-vida (decaimento de 75% da energia de interação inicial).

4.4.3 Distância para a Interação entre Peptídeos e as Proteínas H-2 de Classe I

Nesta etapa deste trabalho, foi possível avaliar a influência da energia de interação intermolecular da rede de aminoácidos que compõe a fenda dos receptores H-2 de classe I sobre os peptídeos, em função da distância entre os centros de massa do peptídeo e da proteína. A contribuição da energia eletrostática de longa distância desempenha um papel importante na cinética de interação entre proteínas, particularmente para complexos proteína/peptídeo. De maneira geral, os sítios de ligação das proteínas são descritos como uma rede de resíduos de aminoácidos que se comunicam estruturalmente e energeticamente, proporcionando um campo de força capaz de atrair o ligante ao receptor (96), o que foi constatado nos experimentos de interação entre os peptídeos e as proteínas H-2, neste trabalho (Figuras 29, 30 e Tabela 10). Esta comunicação entre o sítio de ligação da proteína e o ligante pode favorecer o encontro de ambos, tendo como base as interações eletrostáticas de longo alcance (96).

O encontro de duas proteínas pode ocorrer a uma distância e orientação favoráveis para a ligação entre elas, e deste modo formarem um pré-complexo. Um pré-complexo é um estado transicional para a ligação entre duas proteínas. Se a distância e a orientação das duas proteínas forem favoráveis para a ligação, este encontro pode evoluir formando um complexo estável, dependendo ainda se a energia livre de associação entre eles é negativa. Por outro lado, se este encontro ocorrer a uma distância ou orientação desfavoráveis à formação do complexo, as proteínas rapidamente se dissociam uma da outra (97).

O mecanismo do encontro de duas proteínas para formação de um pré-complexo foi estudado em outros trabalhos, que descrevem a interação entre a proteína bacteriana barnase e seu inibidor barstar (98). Esta interação é considerada uma das mais intensas entre proteínas, com rápida associação entre elas. Estes estudos descrevem que os resíduos de aminoácidos da interface dos sítios de ligação interagem uns com os outros a partir de uma determinada distância entre os seus centros de massa (32 Å) (99, 100).

Durante os experimentos de saída dos peptídeos da fenda da proteína H-2, constatamos que a dissociação do complexo ocorre de forma progressiva, para ambos os tipos de complexos (peptídeos cristalizados e peptídeos derivados da *cyspep*), quando comparamos a distância entre os centros de massa das proteínas e dos peptídeos (Figuras 29 e 30). Estas observações foram feitas de acordo com as condições estabelecidas para os parâmetros das simulações por MetaD, isto é, os

valores da altura e largura das gaussianas adicionadas ao potencial de energia, a frequência com que essas funções são depositadas no potencial e a forma de varredura do espaço das VCs.

Os resultados destes ensaios sugerem que esse comportamento pode ocorrer como uma das etapas do fenômeno de interação entre os peptídeos e as proteínas H-2, aqui simulados a partir da dissociação do peptídeo da fenda. Desta forma, foi possível mapear a ação da energia de interação intermolecular em três regiões distintas: R_1 , quando a influência das interações intermoleculares é máxima; R_2 , quando esta influência se reduz e são observados valores de energia de interação cuja mediana é menor do que a metade da mediana da energia de interação intermolecular da região R_1 ; e R_3 quando não há influência da energia de interação entre a proteína e o peptídeo, com o valor da energia de interação próximo de zero ($0 \pm 5\%$ da energia de interação inicial) (Figuras 29, 30 e Tabela 11).

De um modo geral, podemos observar que além do limite de 25 Å não há influência das proteínas H-2 de classe I sobre os peptídeos avaliados neste trabalho. Estes resultados sugerem a existência de um raio mínimo de ação para que a interação entre peptídeos e a proteína H-2 ocorra concretamente. Este raio mínimo pode ser observado para cada um dos haplótipos tanto nos complexos cristalizados (Figura 30) como para os complexos H-2/peptídeo derivados da *cyspep* (Figura 29). No entanto, esta observação necessita de uma comprovação mais aprofundada, de modo que se possa descrever mais detalhadamente a ação dos receptores H-2 sob os peptídeos.

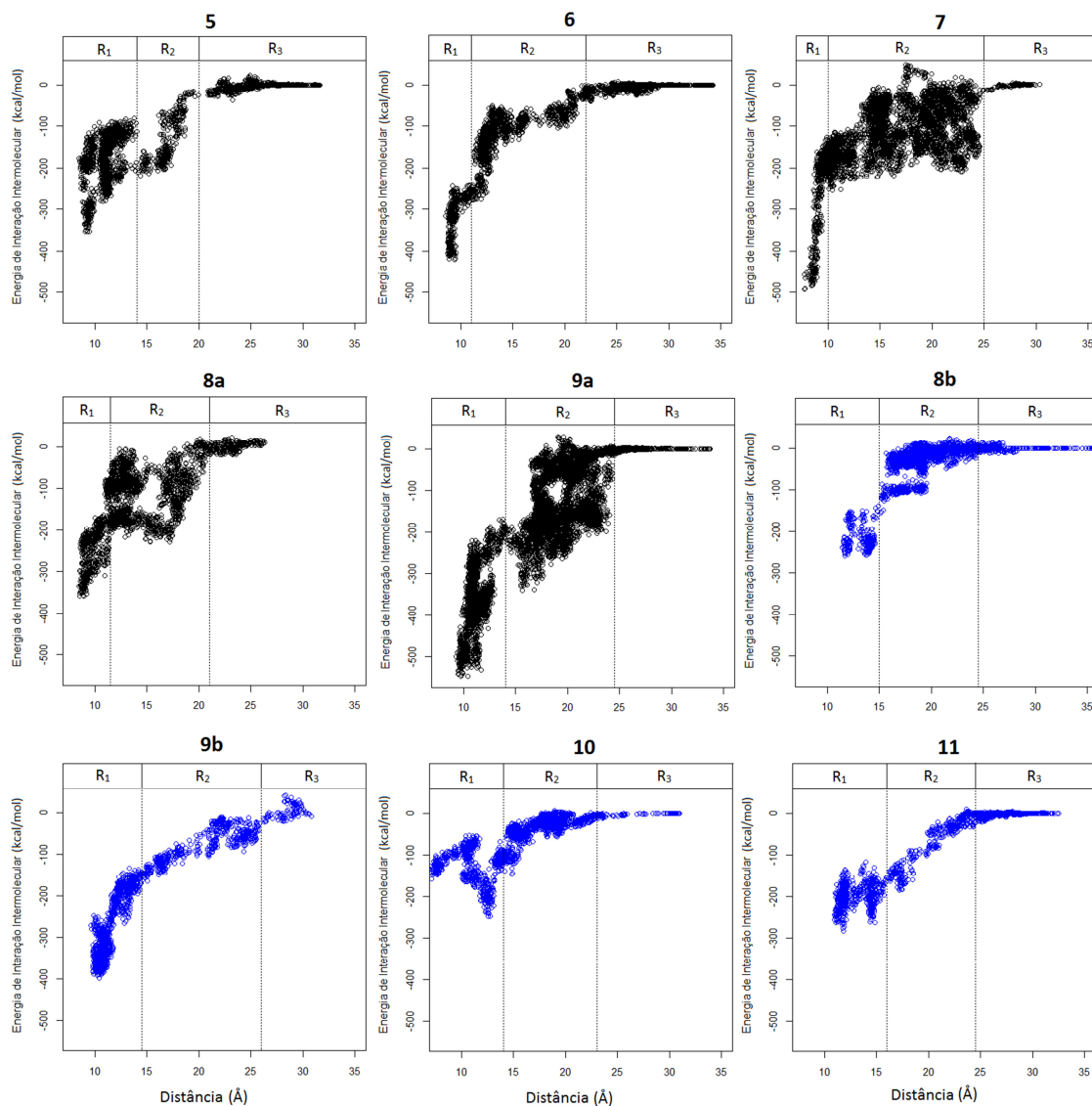


Figura 29: Energia de interação intermolecular pela distância entre os centros de massa da proteína de dos peptídeos da *cyspep*. Nas figuras, a ação da energia intermolecular é dividida em três regiões: R₁, R₂ e R₃. Essas regiões foram divididas de acordo com a distância entre os centros de massa da proteína e do peptídeo e a influência da energia de interação intermolecular em cada uma delas. As figuras em preto representam os complexos do haplótipo D^b e as figuras em azul os complexos do haplótipo L^d.

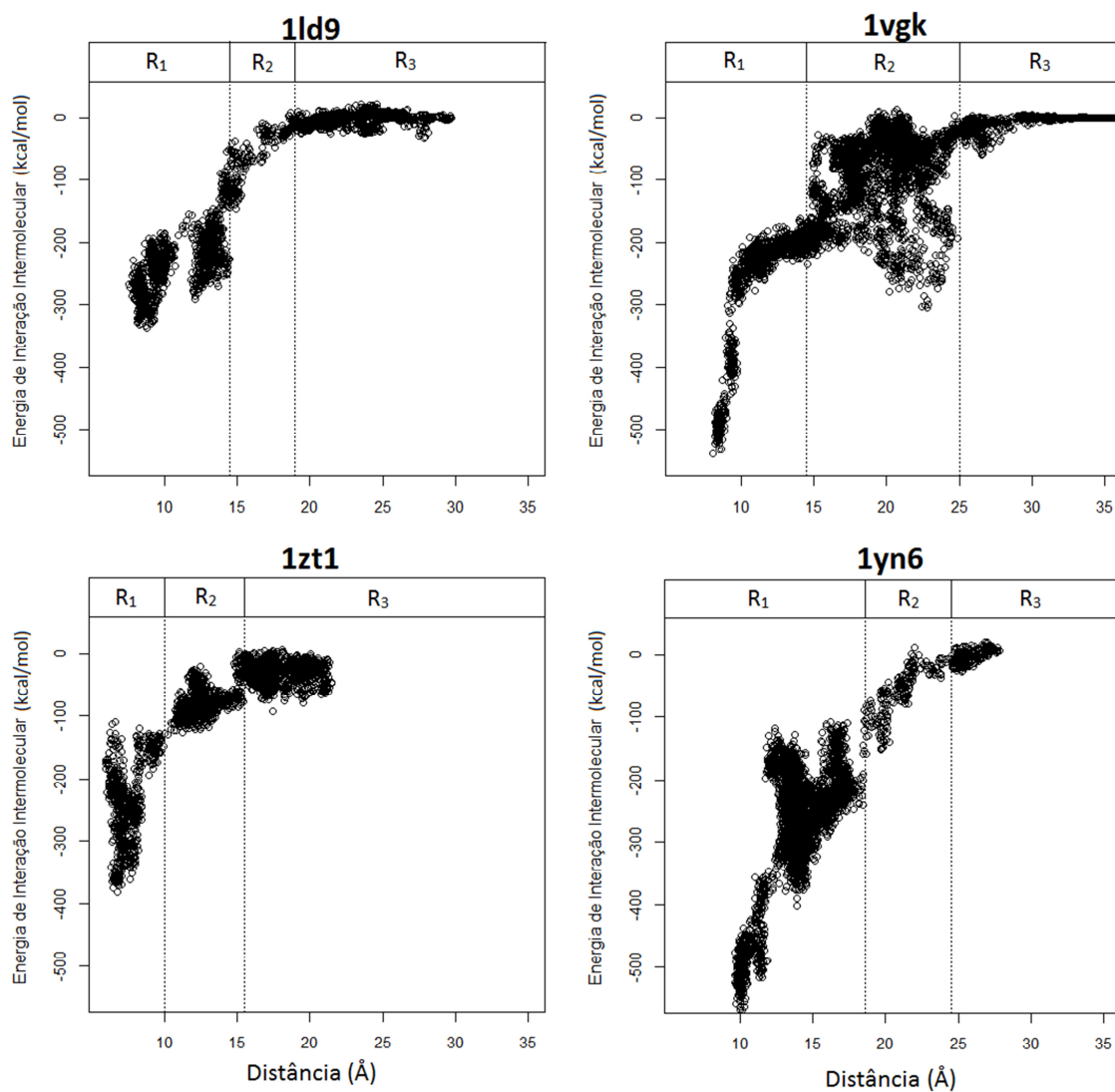


Figura 30: Energia de interação intermolecular pela distância entre os centros de massa da proteína e do peptídeo do conjunto de validação. Nas figuras, a ação da energia intermolecular é dividida em três regiões: R₁, R₂ e R₃. Essas regiões foram divididas de acordo com a distância entre os centros de massa da proteína e do peptídeo e a influência da energia de interação intermolecular em cada uma delas.

Tabela 10: Regiões de interação intermolecular entre para os peptídeos as proteínas H-2 de Classe I.

Identificador dos complexos	R1		R2		R3	
	Limites (Å)	Mediana (kcal/mol)	Limites (Å)	Mediana (kcal/mol)	Limites (Å)	Mediana (kcal/mol)
1*	$d \leq 14,5$	-219,96	$14,5 < d \leq 19,0$	-69,68	$d > 19,0$	-7,28
2*	$d \leq 14,5$	-360,15	$14,5 < d \leq 25,0$	-145,27	$d > 25,0$	-8,81
3*	$d \leq 10,0$	-246,01	$10,0 < d \leq 15,5$	-72,66	$d > 15,5$	-8,74
4*	$d \leq 18,5$	-347,08	$18,5 < d \leq 24,5$	-114,51	$d > 24,5$	-3,90
5	$d \leq 14,0$	-217,83	$14,0 < d \leq 20,0$	-107,04	$d > 20,0$	-6,38
6	$d \leq 11,0$	-331,30	$11,0 < d \leq 22,0$	-145,08	$d > 22,0$	-9,83
7	$d \leq 10,0$	-367,70	$10,0 < d \leq 25,0$	-103,27	$d > 25,0$	-4,61
8a	$d \leq 11,5$	-249,30	$11,5 < d \leq 21,0$	-107,50	$d > 21,0$	-1,74
9a	$d \leq 14,0$	-357,69	$14,0 < d \leq 24,5$	-154,86	$d > 24,5$	-5,82
8b	$d \leq 15,0$	-188,86	$15,0 < d \leq 24,5$	-48,27	$d > 24,5$	-5,74
9b	$d \leq 15,0$	-265,96	$15,0 < d \leq 24,5$	-88,43	$d > 24,5$	-9,90
10	$d \leq 14,0$	-149,68	$14,0 < d \leq 23,0$	-54,34	$d > 23,0$	-4,63
11	$d \leq 16,0$	-198,93	$16,0 < d \leq 24,5$	-99,35	$d > 24,5$	-7,21

d – Distância entre os centros de massa da proteína.

(*) – Complexos PDB: 1=1ld9, 2=1vgk, 3=1zt1 e 4=1yn6.

5 CONCLUSÕES

- A abordagem computacional utilizada em nosso trabalho foi capaz de simular a saída dos peptídeos da fenda de haplótipos H-2 (L^d , K^k , K^d , D^b) de complexos cristalizados e complexos simulados com os peptídeos da *cyspep*;
- O par de variáveis coletivas VC1 e VC2 selecionado foi capaz de descrever o processo de dissociação dos peptídeos avaliados neste estudo;
- Os ensaios computacionais propostos permitiram explorar a superfície de energia livre associada ao processo de dissociação dos peptídeos das proteínas H-2, determinando seus estados de mínimos locais e possibilitando o cálculo da energia livre de dissociação do peptídeo;
- A comparação dos valores de $\Delta G_{\text{dissociação}}$ para os complexos estudados e os dados obtidos do servidor PBePISA indicaram valor de RMSD dentro da faixa de variação esperada, o que valida a utilização da MetaD para prever a energia de dissociação dos peptídeos;
- Para haplótipos H-2 (L^d e D^b), constatamos que a região NH_2 -terminal dos peptídeos derivados da *cyspep* mantiveram ligações de hidrogênio com maiores tempos de formação com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da proteína H-2 (Tyr7, Tyr59, Tyr159 e Tyr171);
- Constatamos que a região $COOH$ -terminal dos peptídeos derivados da *cyspep* mantiveram ligações de hidrogênio com maiores tempo de duração com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da proteína para os complexos do haplótipo H-2 L^d ;
- As análises das ligações de hidrogênio da região NH_2 -terminal dos peptídeos derivados da *cyspep*, com exceção do peptídeo no complexo 11, mostraram que outros resíduos da fenda contribuem na manutenção da estabilidade da interação com o sítio de ligação da proteína H-2, corroborando com o esperado de peptídeos imunogênicos;
- Dentre todos os resíduos de aminoácidos das proteínas H-2 D^b analisadas nos ensaios de simulação, com peptídeos derivados da *cyspep*, o resíduo Glu63 foi o que manteve ligações de hidrogênio mais duradouras com a região NH_2 -terminal do peptídeo, para os complexos 6, 8a e 9a. Este achado corrobora com fato previamente descrito de que este resíduo é uma importante âncora da proteína do H-2;

- A dissociação dos complexos ocorreu de forma progressiva, quando comparamos a distância entre os centros de massa das proteínas e dos peptídeos, tanto para os complexos cristalizados quanto para aqueles derivados da *cyspep*. Isto é um indicativo de uma possível etapa do fenômeno de interação dos peptídeos com as proteínas H-2;
- As análises da energia de interação intermolecular durante o processo de dissociação indicaram três regiões de influência, para todos os ensaios de simulação, com limites variáveis de acordo com o complexo ensaiado.
- O limite de ação da região com menor influência do receptor teve uma variação de até 25 Å e indica a existência de um raio mínimo de ação para o início do processo de interação do peptídeo com a fenda dos receptores H-2.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashford RW. Parasites as indicators of human biology and evolution. *Journal of medical microbiology*. 2000 Sep;49(9):771-2. PubMed PMID: 10966223.
2. Pimenta PFP, Freitas VC, Secundino NFC. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: Mario Alberto Cardoso da Silva Neto CW, Carlos Termignoni, editor. *Temas Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular: Itabajara da Silva Vaz Junior*; 2012. p. 582.
3. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*. 2007 Aug;37(10):1097-106. PubMed PMID: 17517415. Pubmed Central PMCID: 2675784.
4. Noyes H. Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998 Sep-Oct;93(5):657-61. PubMed PMID: 9830534.
5. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1983;77(5):569-96. PubMed PMID: 6197791.
6. Azeredo-Coutinho RB, Conceicao-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007 Jul;101(7):735-7. PubMed PMID: 17368698.
7. Cupolillo E, Boité MC, Porrozzini R. Considerações sobre a taxonomia do gênero *leishmania*. In: Conceicao-Silva F, Alves CR, editors. *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 512.
8. Ministério da Saúde B. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. In: *Epidemiológica DdV*, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
9. Souza W. Doenças negligenciadas. In: *Ciências ABd*, editor. *Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional Estudos estratégicos*. Rio de Janeiro: 56; 2010.
10. Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2007 Nov;8(16):2689-99. PubMed PMID: 17956192.
11. Arevalo J, Ramirez L, Adauí V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verastegui C, et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*. 2007 Jun 15;195(12):1846-51. PubMed PMID: 17492601.
12. Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):595-612. PubMed PMID: 12364371. Pubmed Central PMCID: 126866.
13. Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimaraes ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & vectors*. 2012;5:160. PubMed PMID: 22871236. Pubmed Central PMCID: 3436776.
14. Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Aug;7(4):375-81. PubMed PMID: WOS:000223458200010. English.
15. Pereira BA, Britto C, Alves CR. Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Microbial pathogenesis*. 2012 Feb;52(2):101-8. PubMed PMID: 22178713.
16. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology letters*. 2005 Jun 15;99(1):17-23. PubMed PMID: 15894106.
17. Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of*

- experimental medicine. 1989 Jan 1;169(1):59-72. PubMed PMID: 2521244. Pubmed Central PMCID: 2189187.
18. Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002 Apr;66(4):338-45. PubMed PMID: 12164286.
 19. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews Immunology*. 2002 Nov;2(11):845-58. PubMed PMID: 12415308.
 20. Lemos de Souza V, Ascencao Souza J, Correia Silva TM, Sampaio Tavares Veras P, Rodrigues de-Freitas LA. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000 Dec;2(15):1807-15. PubMed PMID: 11165924.
 21. Afonso LC, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and immunity*. 1993 Jul;61(7):2952-9. PubMed PMID: 8514400. Pubmed Central PMCID: 280944.
 22. Buxbaum LU, Denise H, Coombs GH, Alexander J, Mottram JC, Scott P. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3711-7. PubMed PMID: 14500670.
 23. Barrett AJ. Classification of peptidases. *Methods in enzymology*. 1994;244:1-15. PubMed PMID: 7845199.
 24. Souza AE, Bates PA, Coombs GH, Mottram JC. Null mutants for the *lmcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Feb;63(2):213-20. PubMed PMID: 8008019.
 25. Bart G, Frame MJ, Carter R, Coombs GH, Mottram JC. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997 Sep;88(1-2):53-61. PubMed PMID: 9274867.
 26. Gomes IN, Calabrich AF, Tavares Rda S, Wietzerbin J, de Freitas LA, Veras PS. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2003 Apr;5(4):251-60. PubMed PMID: 12706438.
 27. Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, et al. The multiple *cpb* cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *The Journal of biological chemistry*. 1997 May 30;272(22):14285-93. PubMed PMID: 9162063.
 28. Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6794-801. PubMed PMID: 9862710.
 29. Denise H, McNeil K, Brooks DR, Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infection and immunity*. 2003 Jun;71(6):3190-5. PubMed PMID: 12761098. Pubmed Central PMCID: 155739.
 30. De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci*. 1995 Oct;108 (Pt 10):3219-31. PubMed PMID: 7593283.
 31. Alves CR, Benevolo-De-Andrade TC, Alves JL, Pirmez C. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2004 Mar;26(3):127-35. PubMed PMID: WOS:000222962000003. English.
 32. Nakhaee A, Taheri T, Taghikhani M, Mohebbi M, Salmanian AH, Fasel N, et al. Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Vet Parasitol*. 2004 Jan 30;119(2-3):107-23. PubMed PMID: 14746971.

33. Hide M, Banuls AL. Polymorphisms of *cpb* multicopy genes in the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008 Feb;102(2):105-6. PubMed PMID: 17996911.
34. Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Cseko Y, et al. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Nov;68(1):119-32. PubMed PMID: 7891736.
35. Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, McMahon-Pratt D. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Jan;57(1):101-15. PubMed PMID: 8426606.
36. Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EMB. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Exp Parasitol*. 2005 Jan;109(1):38-48. PubMed PMID: WOS:000226464500006. English.
37. Alves CR, Pontes de Carvalho LC, Souza AL, De Simone SG. A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases. *Cytobios*. 2001;104(405):33-41. PubMed PMID: 11219729.
38. Pereira BAS, Silva FS, Rebello KM, Marin-Villa M, Traub-Cseko YM, Andrade TCB, et al. In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* experimental murine infection. *Bmc Immunol*. 2011 Aug 8;12. PubMed PMID: WOS:000294564800001. English.
39. Souza-Silva F, Pereira BAS, Finkelstein LC, Zucolotto V, Caffarena ER, Alves CR. Dynamic identification of H2 epitopes from *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* cysteine proteinase B with potential immune activity during murine infection. *J Mol Recognit*. 2014 Feb;27(2):98-105. PubMed PMID: WOS:000329742600006. English.
40. Auffray C, Lillie JW, Korman AJ, Boss JM, Frechin N, Guillemot F, et al. Structure and expression of HLA-DQ alpha and -DX alpha genes: interallelic alternate splicing of the HLA-DQ alpha gene and functional splicing of the HLA-DQ alpha gene using a retroviral vector. *Immunogenetics*. 1987;26(1-2):63-73. PubMed PMID: 3610256.
41. Dafforn TRL, A. M. Proteins of the major histocompatibility complex and their interactions with T-cell receptors. In: Kleantous C, editor. *Frontiers in Molecular Biology - Protein-protein Recognition*. 31. Oxford: Oxford University Press; 2000. p. 162-72.
42. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NPN, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999 Nov;50(3-4):213-9. PubMed PMID: WOS:000084029500010. English.
43. Persson K, Schneider G. Three-dimensional structure of MHC class I peptide complexes: Implications for peptide recognition. *Archivum Immunologia et Therapiae Experimentalis*. 2000;48:135-42.
44. Hedrick PW, Whittam TS, Parham P. Heterozygosity at individual amino acid sites: extremely high levels for HLA-A and -B genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 1;88(13):5897-901. PubMed PMID: 2062867. Pubmed Central PMCID: 51985.
45. Kellenberger C, Roussel A, Malissen B. The H-2Kk MHC peptide-binding groove anchors the backbone of an octameric antigenic peptide in an unprecedented mode. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3819-25. PubMed PMID: 16148128.
46. Antes I, Siu SW, Lengauer T. DynaPred: a structure and sequence based method for the prediction of MHC class I binding peptide sequences and conformations. *Bioinformatics*. 2006 Jul 15;22(14):e16-24. PubMed PMID: 16873467.
47. Roomp K, Antes I, Lengauer T. Predicting MHC class I epitopes in large datasets. *BMC bioinformatics*. 2010;11:90. PubMed PMID: 20163709. Pubmed Central PMCID: 2836306.

48. Hartmann C, Antes I, Lengauer T. IRECS: a new algorithm for the selection of most probable ensembles of side-chain conformations in protein models. *Protein Sci.* 2007 Jul;16(7):1294-307. PubMed PMID: 17567749. Pubmed Central PMCID: 2206697.
49. Knapp B, Omasits U, Schreiner W. Side chain substitution benchmark for peptide/MHC interaction. *Protein Sci.* 2008 Jun;17(6):977-82. PubMed PMID: 18434501. Pubmed Central PMCID: 2386744.
50. Karplus M, Petsko GA. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature.* 1990 Oct 18;347(6294):631-9. PubMed PMID: 2215695.
51. Born M, Oppenheimer R. Zur Quantentheorie der Molekeln" [On the Quantum Theory of Molecules. *Annalen der Physik (in German).* 1927;389(20):457-84.
52. Adcock SA, McCammon JA. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev.* 2006 May;106(5):1589-615. PubMed PMID: WOS:000237579300004. English.
53. Lennard-Jones JE. *Interatomic forces.* Calcutta: Indian association for the cultivation of science; 1939. 1 p.l., 44 p. p.
54. Hamelberg D, Mongan J, McCammon JA. Accelerated molecular dynamics: A promising and efficient simulation method for biomolecules. *J Chem Phys.* 2004 Jun 22;120(24):11919-29. PubMed PMID: WOS:000221907800065. English.
55. Darve E, Rodriguez-Gomez D, Pohorille A. Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations. *J Chem Phys.* 2008 Apr 14;128(14):144120. PubMed PMID: 18412436.
56. Torrie GM, Valleau JP. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *J Comput Phys.* 1977 February 1977;23(2):187-99.
57. Grubmuller H. Predicting slow structural transitions in macromolecular systems: Conformational flooding. *Physical review E, Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics.* 1995 Sep;52(3):2893-906. PubMed PMID: 9963736.
58. Laio A, Parrinello M. Escaping free-energy minima. *P Natl Acad Sci USA.* 2002 Oct 1;99(20):12562-6. PubMed PMID: WOS:000178391700015. English.
59. Barducci A, Bonomi M, Parrinello M. Metadynamics. *Wires Comput Mol Sci.* 2011 Sep-Oct;1(5):826-43. PubMed PMID: WOS:000296005100013. English.
60. Iannuzzi M, Laio A, Parrinello M. Efficient exploration of reactive potential energy surfaces using Car-Parrinello molecular dynamics. *Phys Rev Lett.* 2003 Jun 13;90(23):238302. PubMed PMID: 12857293.
61. Laio A, Rodriguez-Forteza A, Gervasio FL, Ceccarelli M, Parrinello M. Assessing the accuracy of metadynamics. *The journal of physical chemistry B.* 2005 Apr 14;109(14):6714-21. PubMed PMID: 16851755.
62. Gervasio FL, Laio A, Parrinello M. Flexible docking in solution using metadynamics. *Journal of the American Chemical Society.* 2005 Mar 2;127(8):2600-7. PubMed PMID: 15725015.
63. Bussi G, Laio A, Parrinello M. Equilibrium free energies from nonequilibrium metadynamics. *Phys Rev Lett.* 2006 Mar 10;96(9). PubMed PMID: WOS:000235905700006. English.
64. Laio A, Gervasio FL. Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science. *Rep Prog Phys.* 2008 Dec;71(12). PubMed PMID: WOS:000261185700002. English.
65. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):235-42. PubMed PMID: WOS:000084896300069. English.
66. Balendiran GK, Solheim JC, Young AC, Hansen TH, Nathenson SG, Sacchettini JC. The three-dimensional structure of an H-2Ld-peptide complex explains the unique interaction of Ld with beta-2 microglobulin and peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):6880-5. PubMed PMID: 9192660. Pubmed Central PMCID: 21253.

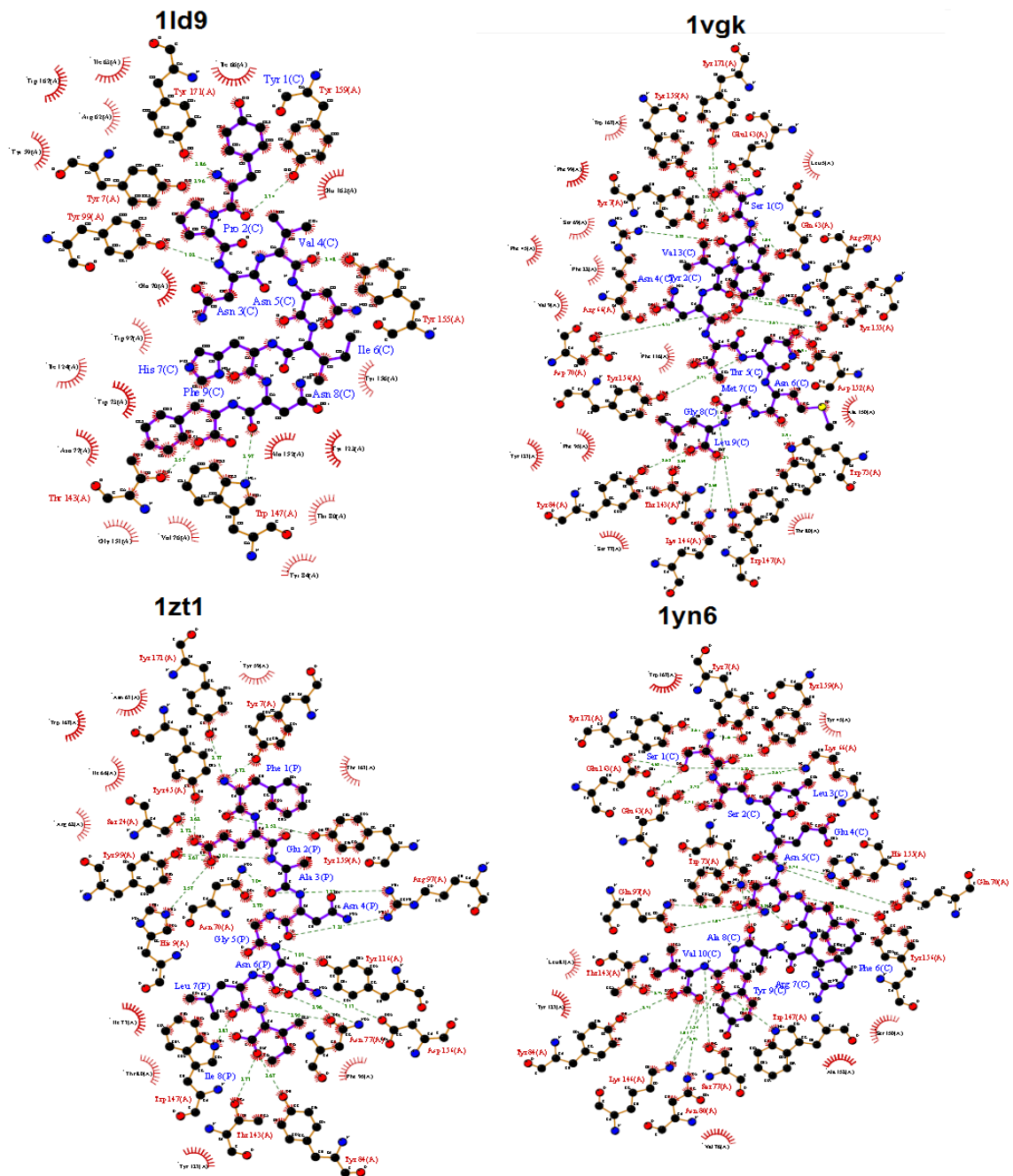
67. Zhou M, Xu Y, Liu Y, Gao GF, Tien P, Rao Z. The crystal structure of class I Major histocompatibility complex, H-2Kd at 2.0 Å resolution. To be Published. To be Published.
68. Turner SJ, Kedzierska K, Komodromou H, La Gruta NL, Dunstone MA, Webb AI, et al. Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8⁺ T cell populations. *Nature immunology*. 2005 Apr;6(4):382-9. PubMed PMID: 15735650.
69. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph Model*. 1996 Feb;14(1):33-8. PubMed PMID: WOS:A1996UH51500005. English.
70. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem*. 1983;4(2):187-217. PubMed PMID: ISI:A1983QP42300010. English.
71. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1983;79:926-35.
72. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*. 2005 Dec;26(16):1781-802. PubMed PMID: WOS:000233021400007. English.
73. Swope WC, Andersen HC, Berens PH, Wilson KR. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *J Chem Phys*. 1982;76(637).
74. Ryckaert JP, Ciccoti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comp Phys*. 1977;23(3):327-41.
75. Madden DR. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annual review of immunology*. 1995;13:587-622. PubMed PMID: 7612235.
76. RCoreTeam. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
77. Friedman AJ, Durrant JD, Pierce LC, McCorvie TJ, Timson DJ, McCammon JA. The molecular dynamics of *Trypanosoma brucei* UDP-galactose 4'-epimerase: a drug target for African sleeping sickness. *Chemical biology & drug design*. 2012 Aug;80(2):173-81. PubMed PMID: 22487100. Pubmed Central PMCID: 3399956.
78. Lindert S, McCammon JA. Dynamics of *Plasmodium falciparum* enoyl-ACP reductase and implications on drug discovery. *Protein Sci*. 2012 Nov;21(11):1734-45. PubMed PMID: 22969045. Pubmed Central PMCID: 3527710.
79. Devarajan S, Sharmila JS. Computational Studies of Beta Amyloid (Aβ42) with p75^{NTR} Receptor: A Novel Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Advances in bioinformatics*. 2014;2014:736378. PubMed PMID: 25477959. Pubmed Central PMCID: 4244936.
80. Simoes-Pires C, Zwick V, Nurisso A, Schenker E, Carrupt PA, Cuendet M. HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs? *Molecular neurodegeneration*. 2013;8:7. PubMed PMID: 23356410. Pubmed Central PMCID: 3615964.
81. Meijers R, Lai CC, Yang YT, Liu JH, Zhong WM, Wang JH, et al. Crystal structures of murine MHC class II-D-b and K-b molecules in complex with CTL epitopes from influenza A virus: Implications for TCR repertoire selection and immunodominance. *J Mol Biol*. 2005 Feb 4;345(5):1099-110. PubMed PMID: WOS:000226531400012. English.
82. Pimentel-Gomes F. *Curso de Estatística Experimental*. 15 ed. Piracicaba: ESALQ; 2000. 477 p.
83. Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2002 Nov;9(6):1235-9. PubMed PMID: 12414755. Pubmed Central PMCID: 130103.
84. Zacharias M, Springer S. Conformational flexibility of the MHC class I α1-α2 domain in peptide bound and free states: a molecular dynamics simulation study. *Biophysical*

- journal. 2004 Oct;87(4):2203-14. PubMed PMID: 15454423. Pubmed Central PMCID: 1304646.
85. Kastritis PL, Moal IH, Hwang H, Weng Z, Bates PA, Bonvin AM, et al. A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. *Protein Sci.* 2011 Mar;20(3):482-91. PubMed PMID: 21213247. Pubmed Central PMCID: 3064828.
86. Raveh B, London N, Schueler-Furman O. Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins. *Proteins.* 2010 Jul;78(9):2029-40. PubMed PMID: WOS:000278278600002. English.
87. Leaver-Fay A, O'Meara MJ, Tyka M, Jacak R, Song Y, Kellogg EH, et al. Scientific benchmarks for guiding macromolecular energy function improvement. *Methods in enzymology.* 2013;523:109-43. PubMed PMID: 23422428. Pubmed Central PMCID: 3724755.
88. Ferber M, Zoete V, Michielin O. T-cell receptors binding orientation over peptide/MHC class I is driven by long-range interactions. *PloS one.* 2012;7(12):e51943. PubMed PMID: 23251658. Pubmed Central PMCID: 3522592.
89. Busch DH, Pamer EG. MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol.* 1998 May 1;160(9):4441-8. PubMed PMID: 9574549.
90. Levitsky V, Zhang QJ, Levitskaya J, Masucci MG. The life span of major histocompatibility complex-peptide complexes influences the efficiency of presentation and immunogenicity of two class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes in the Epstein-Barr virus nuclear antigen 4. *The Journal of experimental medicine.* 1996 Mar 1;183(3):915-26. PubMed PMID: 8642295. Pubmed Central PMCID: 2192361.
91. Cino EA, Wong-ekkabut J, Karttunen M, Choy WY. Microsecond molecular dynamics simulations of intrinsically disordered proteins involved in the oxidative stress response. *PloS one.* 2011;6(11):e27371. PubMed PMID: 22125611. Pubmed Central PMCID: 3220680.
92. Kawaguchi K, Saito H, Nagao H. Molecular Dynamics Study of Hsp90 and ADP: Hydrogen Bond Analysis for ADP Dissociation. *Proceedings of the 12th Asia Pacific Physics Conference (APPC12); Japan: JPS Conference Proceedings; 2014.*
93. Hudrisier D, Mazarguil H, Laval F, Oldstone MB, Gairin JE. Binding of viral antigens to major histocompatibility complex class I H-2Db molecules is controlled by dominant negative elements at peptide non-anchor residues. Implications for peptide selection and presentation. *The Journal of biological chemistry.* 1996 Jul 26;271(30):17829-36. PubMed PMID: 8663374.
94. Hunenberger PH, Borjesson U, Lins RD. Electrostatic Interactions in Biomolecular Systems. *Chimia.* 2001;55:861-6.
95. Garstka MA, Fish A, Celie PH, Joosten RP, Janssen GM, Berlin I, et al. The first step of peptide selection in antigen presentation by MHC class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Feb 3;112(5):1505-10. PubMed PMID: 25605945. Pubmed Central PMCID: 4321303.
96. Sundberg EJ. The Molecular Architecture of Protein-Protein Binding Sites. In: Nussinov R. SG, editor. *Computational Protein-Protein Interactions.* Florida: CRC Press; 2009. p. 43-56.
97. Janin J. Kinetics and thermodynamics of protein-protein interactions. In: Kleanthous C, editor. *Protein-Protein Recognition.* New York: Oxford Univ Press; 2000. p. 1-32.
98. Hoefling M, Gottschalk KE. Barnase-Barstar: from first encounter to final complex. *Journal of structural biology.* 2010 Jul;171(1):52-63. PubMed PMID: 20211732.
99. Spaar A, Dammer C, Gabdoulline RR, Wade RC, Helms V. Diffusional encounter of barnase and barstar. *Biophysical journal.* 2006 Mar 15;90(6):1913-24. PubMed PMID: 16361332. Pubmed Central PMCID: 1386772.

100. Spaar A HV. Free Energy Landscape of Protein-Protein Encounter Resulting from Brownian Dynamics Simulations of Barnase:Barstar. *J Chem Theory Comput.* 2005;1:723-36.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A - INTERAÇÕES ENVOLVENDO OS LIGANTES E AS PROTEÍNAS H-2 DE CLASSE I PARA OS COMPLEXOS CRISTALOGRAFICOS



APÊNDICE B - ARQUIVOS DE CONFIGURAÇÃO PARA EXECUÇÃO DAS SIMULAÇÕES DA METADINÂMICA

```
#####
## JOB DESCRIPTION                                     ##
#####
# restart of a run
# in a Water Box
# Metadynamica Protein Constrain
#####
## ADJUSTABLE PARAMETERS                             ##
#####

structure      ../../equilibrio/lyn6_p11_wb_ion.psf
coordinates    ../../equilibrio/lyn6_p11_wb_ion.pdb

outputname     meta_ang_dist_trp147

set temperature 310

set inputname  ../../equilibrio/lyn6_p11_eq_ptn_fix_2

# Continuing a job from the restart files
# if {0} is true
set rs        0 ;# use restart file? 1 = yes
if {$rs==1} {
binCoordinates $inputname.restart.coor
#binVelocities $inputname.restart.vel ;# remove the "temperature"
entry if you use this!
extendedSystem $inputname.restart.xsc
}
# Continuing a job but not from restart files
if {$rs==0} {
binCoordinates $inputname.coor
# binVelocities $inputname.vel ;# remove the "temperature" entry
if you use this!
extendedSystem $inputname.xsc
}
firsttimestep 0

#####
## SIMULATION PARAMETERS                             ##
#####

# Input
paraTypeCharmm on
parameters    ../../equilibrio/common/par_all27_prot_lipid.inp

# NOTE: Do not set the initial velocity temperature if you
# have also specified a .vel restart file!
temperature   $temperature
#keep temp if want to assign new velocitites

# Periodic Boundary conditions
# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!
```

```

if {0} {
# you get the info to make the following from:
# set sel [atomselect top all]
# cell basis vectors:
# measure minmax $sel # then take the difference
# cellOrigin:
# measure center $sel
#
cellBasisVector1    67.5    0.0    0.0
cellBasisVector2    0.0    63.7    0.0
cellBasisVector3    0.0    0.    64.3
cellOrigin           62.3    4.6    18.4
}
wrapWater           on
wrapAll             on

# Force-Field Parameters
exclude             scaled1-4
1-4scaling          1.0
cutoff              12.0
switching           on
switchdist          10.0
pairlistdist        13.5

# Integrator Parameters
timestep            2.0
rigidBonds          all
nonbondedFreq       1
fullElectFrequency  2
stepspercycle       10

#PME (for full-system periodic electrostatics)
if {1} {
PME                 yes
PMEGridSpacing      1.0
}

# Constant Temperature Control
langevin            on      ;# do langevin dynamics
langevinDamping     5      ;# damping coefficient (gamma) of 5/ps
langevinTemp        $temperature
langevinHydrogen    no     ;# don't couple langevin bath to hydrogens

# Constant Pressure Control (variable volume)
if {1} {
useGroupPressure    yes ;# needed for 2fs steps
useFlexibleCell     no  ;# no for water box, yes for membrane
useConstantArea     no  ;# no for water box, yes for membrane

langevinPiston      on
langevinPistonTarget 1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod 100.
langevinPistonDecay 50.
langevinPistonTemp  $temperature
}

```

```

# Output
# outputName          $outputname

restartfreq           500      ;# 500steps = every 1ps
dcdfreq              500
xstFreq              500
outputEnergies       500
# outputPressure      100

# Fixed Atoms Constraint (set PDB beta-column to 1)
if {0} {
fixedAtoms            on
fixedAtomsFile        fix_bck_ptn.pdb
fixedAtomsCol         B
}

# Apply Harmonic Restraints to selection atoms
if {1} {
constraints on
consref    ../../equilibrio/fix_ca_p1.pdb
conskfile  ../../equilibrio/fix_ca_p1.pdb
conskcol   B
}

# IMD Settings (can view sim in VMD)
if {0} {
IMDon            on
IMDport          3000      ;# port number (enter it in VMD)
IMDfreq          1         ;# send every 1 frame
IMDwait          no        ;# wait for VMD to connect before running?
}

#####
## EXTRA PARAMETERS                                     ##
#####
# Put here any custom parameters that are specific to
# this job (e.g., SMD, TclForces, etc...)
colvars on
colvarsConfig colvar_ang_dist_trp147.conf # colective variable
configuration file
#colvarsInput meta_3.restart.colvars.state # COMMENT OUT UNLEES YOU
RESTART A JOB

#####
## EXECUTION SCRIPT                                     ##
#####

# Minimization
if {0} {
minimize          100
reinitvels        $temperature ;# the temperature statement above
verforms vel reassignment
}

run 5000000 ;# 10ns para passos de 2fs

```

Arquivo colvar_ang_dist_trp147.conf

```
#####  
## COLVARS DISTANCE AND ANGLE #  
#####  
  
# Collective Variable Distance and Angle (TRP 147)  
  
colvarsTrajFrequency 1000  
colvar {  
  name r1  
  lowerBoundary 0.0  
  lowerWallConstant 10.0  
  upperBoundary 28.0  
  upperWallConstant 10.0  
  width 1.0  
  outputVelocity on  
  outputAppliedForce on  
  distance {  
    group1 { psfSegId P2  
              atomNameResidueRange CA 6-6  
            }  
  
    group2 { psfSegId P1  
              atomNameResidueRange CA 147-147  
            }  
  }  
}  
  
colvar {  
  name a1  
  lowerBoundary 0.0  
  upperBoundary 180.0  
  width 10.0  
  outputVelocity on  
  outputAppliedForce on  
  angle {  
    group1 { psfSegId P2  
              atomNameResidueRange CA 6-6  
            }  
    group2 { psfSegId P2  
              atomNameResidueRange CA 1-9  
            }  
    group3 { psfSegId P1  
              atomNameResidueRange CA 2-182  
            }  
  }  
}  
  
metadynamics {  
  name metadyn_trp147  
  colvars r1 a1  
  hillWeight 0.5 # Default is 0.01 - higher numbers = faster  
  dumpFreeEnergyFile on  
  saveFreeEnergyFile on  
  newHillFrequency 100 # Default is 100 - lower numbers = faster  
}  
  
histogram {  
  colvars r1 a1  
  outputFreq 1000  
}
```



Exploring the unbinding of *Leishmania (L.) amazonensis* CPB derived-epitopes from H2 MHC class I proteins

Artur M. L. Brandt,^{1,2} Paulo Ricardo Batista,^{1*} Franklin Souza-Silva,³ Carlos Roberto Alves,^{3*} and Ernesto Raul Caffarena¹

¹ Programa De Computação Científica (PROCC), Fundação Oswaldo Cruz, Mangueiras, Rio De Janeiro, RJ, CEP 21040 360, Brazil

² Faculdade De Educação Tecnológica Do Estado Do Rio De Janeiro (FAETERJ), Rio De Janeiro, RJ, CEP 21311 280, Brazil

³ Laboratório De Biologia Molecular E Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Mangueiras, Rio De Janeiro, RJ, CEP 21040 360, Brazil

ABSTRACT

New strategies to control *Leishmania* disease demand an extensive knowledge about several aspects of infection including the understanding of its molecular events. In murine models, cysteine proteinase B from *Leishmania amazonensis* promotes regulation of immune response, and fragments from its C-terminus extension (*cyspep*) can play a decisive role in the host-parasite interaction. The interaction between *cyspep*-derived peptides and major histocompatibility complex (MHC) proteins is a crucial factor in *Leishmania* infections. Seven *cyspep*-derived peptides, previously identified as capable of interacting with H-2 (murine) MHC class I proteins, were studied in this work. We established a protocol to simulate the unbinding of these peptides from the cleft of H-2 receptors. From the simulations, we estimated the corresponding free energy of dissociation (ΔG_d) and described the molecular events that occur during the exit of peptides from the cleft. To test the reliability of this method, we first applied it to a calibration set of four crystallographic MHC/peptide complexes. Next, we explored the unbinding of the seven complexes mentioned above. Results were consistent with ΔG_d values obtained from surface plasmon resonance (SPR) experiments. We also identified some of the primary interactions between peptides and H-2 receptors, and we detected three regions of influence for the interaction. This pattern was systematically observed for the peptides and helped determine a minimum distance for the real interaction between peptides and H-2 proteins occurring at ~ 25 Å.

Proteins 2016; 00:000–000.

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: free energy surface; H-2 D^b, H-2 K^d, H-2 K^k and H-2 L^d haplotypes; immunological epitopes; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; metadynamics.