

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOÃO HERMÍNIO MARTINS DA SILVA

Identificação e validação de antagonistas potenciais de APRIL através da aplicação de cálculos de energia livre e dinâmica molecular

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Ernesto Raúl Caffarena

Prof. Dr. Wilson Savino

RIO DE JANEIRO

2011

Índice

Índice	ii
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
Agradecimentos	x
Resumo.....	xiv
Abstract	xvi
1. Introdução	1
1.1. Papel biológico das proteínas da família do Fator de Necrose Tumoral.....	2
1.2. As proteínas “Ligante Indutor de Proliferação” (APRIL) e “Fator de Ativação de Células B” (BAFF) como alvos terapêuticos.....	5
1.3. Estrutura dos genes que codificam APRIL e BAFF	10
1.4. Semelhanças e diferenças estruturais entre APRIL e BAFF	12
1.5. Afinidades experimentais entre TACI/BCMA e APRIL/BAFF	15
1.6. Desenho Racional de Fármacos baseado em estrutura	16
1.7. Interações Proteína-Proteína	17
1.8. Abundância dos diferentes aminoácidos em proteínas.....	20
1.9. Bloqueio de interações proteína-proteína	22
1.10. Mutagênese experimental por alanina	23
1.11. Alanine scanning computacional.....	25
1.12. Métodos baseados no cálculo de energia livre	27
1.13. Energia de Interação Linear (LIE).....	29
1.14. Racional e motivação	32
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. Metodologia	36
3.1. Modelagem Comparativa	37
3.2. Dinâmica molecular aplicada ao Cálculo de Energia Livre e análise da estabilidade dos peptídeos mutados	39
3.3. Desenho de peptídeos com potencial capacidade inibitória para APRIL.....	43
3.4. Estrutura mínima de TACI necessária para interação do APRIL.....	45
3.5. Mutagênese computacional.....	46

3.6.	Superfície Acessível ao Solvente	47
3.7.	Clonagem e Expressão dos mutantes de TACI	47
3.8.	Cultivo Celular	48
3.9.	Transfecção	49
3.10.	Imunoblotting.....	49
3.11.	ELISA	50
4.	<i>Resultados e discussão</i>	51
4.1.	Alinhamento sequencial.....	52
4.2.	Construção do modelo tridimensional do trímero da APRIL humana	57
4.3.	Estrutura mínima de TACI necessária para interação do APRIL.....	60
4.4.	Cálculo de energia livre de ligação de TACI no reconhecimento de APRIL e BAFF	64
4.5.	Comparação do método LIE com alanine scanning experimental e outros métodos computacionais	69
4.6.	Elaboração de peptídeos mutados.....	73
4.7.	Análise da estrutura secundária dos peptídeos mutados.....	77
4.8.	Potenciais eletrostático e de Lennard-Jones.....	80
4.9.	Análise das ligações hidrogênio	83
4.10.	Raiz do desvio quadrático médio (RMSD)	88
4.11.	Análise de pontes salinas entre complexos peptídeo/APRIL e peptídeo/BAFF	89
4.12.	Análise da superfície acessível ao solvente dos peptídeos associados a APRIL e BAFF	92
4.13.	Resultados do ELISA competitivo	93
5.	<i>Conclusões e perspectivas</i>	102
6.	<i>Referências Bibliográficas</i>	107
7.	<i>Anexo I</i>	119
7.1.	Lista de primers utilizados na PCR.	120
7.2.	Protocolos do PCR para clonagem de T8, T9, T10 e T11	120
7.3.	Protocolo do ELISA	126
7.4.	Protocolo de transfecção com CaCl ₂	127
8.	<i>Anexo II</i>	128
8.1.	Parâmetros de minimização de energia e dinâmica molecular utilizados no programa Q e no GROMACS.....	129
8.1.1.	Minimização de energia no GROMACS	129
8.1.2.	Equilibração 1.....	130
8.1.3.	Equilibração 2	131

8.1.4.	Equilibração 3	132
8.1.5.	Dinâmica Molecular no GROMACS	133
8.1.6.	Minimização com o programa Q.....	134
8.1.7.	Dinâmica molecular com o programa Q	134
9.	<i>Anexo III</i>	135

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura geral da família TNF, exemplificada pela molécula APRIL (ligante).....	4
Figura 2 – Sinalização e especificidade de APRIL e BAFF e seus receptores: TACI, BCMA, BAFF-R, <i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i> (HSPG) e o hipotético receptor de APRIL.	8
Figura 3 – Organização genômica de BAFF, APRIL e seus receptores.	11
Figura 4 – Sobreposição das estruturas tridimensionais de APRIL e BAFF..	14
Figura 5 – Distribuição dos aminoácidos em diferentes proteínas.....	20
Figura 6 – Distribuição dos aminoácidos presentes em diversas interfaces proteicas.	21
Figura 7 – Frequência de aminoácidos presentes na interface proteica e que compõem <i>hot spots</i>	22
Figura 8 - Bibliotecas combinatoriais de substituição por alanina.....	24
Figura 9 – Modelo do complexo construído para os cálculos de energia livre.....	42
Figura 10 – Pontes dissulfídicas presentes no domínio rico em cisteína de TACI.....	46
Figura 11 – Alinhamento interespecífico da sequência linear e filogenia de APRIL.	53
Figura 12 – Estrutura secundária de APRIL humana encontrada no monômero.	54
Figura 13 - Alinhamento entre as sequências dos monômeros secretados de APRIL e BAFF isoladas de <i>Homo sapiens</i> e <i>Mus musculus</i>	55
Figura 14 – Gráfico de Ramachandran do modelo do trímero da APRIL humana.	58
Figura 15 – Detalhe das ligações de Hidrogênio formadas entre a tríade DHL de TACI e APRIL.	59
Figura 16 – Perfil eletrostático de APRIL dimérico complexado com TACI.....	60
Figura 17 – Sequencia de TACI_D2..	61
Figura 18 - Estrutura secundária de TACI em diferentes condições de clivagem das pontes dissulfeto.....	63
Figura 19 – Análise da variação de energia livre utilizando LIE.	67
Figura 20 – Superfície de contato entre APRIL e TACI e hot spot calculado por LIE.....	69
Figura 21 – Comparação dos <i>hot spots</i> encontrados por diferentes métodos computacionais e shotgun <i>alanine scanning</i> experimental.	71
Figura 22 – <i>Shotgun alanine scanning</i> realizado com a estrutura de TACI_D2 ligada com APRIL ou BAFF.	73
Figura 23 – Representação estrutural de TACI e dos peptídeos mutados, tendo por base a estrutura nativa de TACI..	76

Figura 24 – Estrutura secundária de TACI e dos peptídeos mutados, em ausência da ponte dissulfeto Cys71-Cys86, calculada com DSSP.	78
Figura 25 – Análise da estrutura secundária realizada com o programa DSSP durante a dinâmica molecular dos peptídeos T8 a T13 em complexo com APRIL.	79
Figura 26 - Potencial eletrostático dos peptídeos complexados a APRIL e BAFF.	81
Figura 27 - Potencial de Lennard-Jones dos peptídeos complexado a APRIL e BAFF.	82
Figura 28 – Relação de ligações hidrogênio entre os peptídeos e APRIL.	84
Figura 29 – Número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e APRIL ao longo do tempo.	86
Figura 30 – Número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e BAFF durante a dinâmica.	87
Figura 31 – Raiz do desvio quadrático médio calculado para os C α de T8 a T13 em complexo com APRIL e BAFF.	88
Figura 32 – Estabilidade das pontes salinas encontradas entre os peptídeos mutados e APRIL.	90
Figura 33 - Estabilidade das pontes salinas encontradas entre os peptídeos mutados e BAFF.	91
Figura 34 – Superfície acessível ao solvente calculada após a dinâmica.	93
Figura 35 – <i>Immunoblotting</i> para detecção de TACI e peptídeos mutados.	94
Figura 36 – ELISA competitivo com BCMA como <i>coating</i> e efeito em APRIL e BAFF.	95
Figura 37 – Estrutura do gene que codifica TACI.	96
Figura 38 – Elisa competitivo tendo como receptores TACI, e os peptídeos T8, T9, T10 e T11, usando BCMA como <i>coating</i>	97
Figura 39 - Elisa competitivo tendo como receptores TACI, e os peptídeos T8, T9, T10 e T11, usando TACI como <i>coating</i>	97
Figura 40 – Elisa usando BCMA, TACI (Alexis) e TACI purificado (<i>home made</i>).	98
Figura 41 – Elisa competitivo confirmatório aplicando T8 e T10 sob diferentes <i>coatings</i>	99
Figura 42 – Elisa competitivo mostrando o efeito de T8 e T10 sem o domínio TMD.	100

Lista de tabelas

Tabela 1 – Afinidade calculada entre APRIL/BAFF e receptores.....	15
Tabela 2 – Substituições observadas entre APRIL humana e murina na região de reconhecimento.	54
Tabela 3 – Valores de energia potencial eletrostática, Lennard-Jones e energia livre de ligação calculados para todos os resíduos de TACI_D2 em complexo com APRIL.	65
Tabela 4 - Valores de energia potencial eletrostática, Lennard-Jones e energia livre de ligação calculados para todos os resíduos de TACI_D2 em complexo com BAFF.....	66
Tabela 5 – Relação das mutações sugeridas em TACI, em função das análises energética e estrutural.....	74
Tabela 6 – Número médio de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e os ligantes.....	85
Tabela 7 – Valores médios de RMSD encontrados durante a dinâmica molecular com os peptídeos, acompanhados do desvio padrão.....	89

Lista de abreviaturas

AKT – Proteína cinase B
AP-1 – Proteína ativadora 1
APRIL – Ligante indutor de proliferação
BAFF- Fator de ativação de células B
BAFF-R- Receptor do fator de ativação de células B
BCMA – Antígeno de maturação de células B
BR3 – Receptor 3 do fator de ativação de células B
CRD – Domínio rico em cisteína
DO – Densidade ótica
DSSP – Dicionário de estrutura secundária de proteínas
ELISA – Ensaio imunoenzimático de adsorção
ERK – Cinase regulada por sinal extracelular
EST – Marcador de sequência expressa
FC – Fragmento cristalizável
FEP – Perturbação da energia livre
GAG - Glicosaminoglicanas
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HSPG – Proteoglicana de heparan sulfato
IgA – Imunoglobulina A
IgG - Imunoglobulina G
JNK – Cinase C-Jun amino terminal
LIE – Energia de interação linear
LLC – Leucemia linfóide Crônica
MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno
MM-PBSA – do inglês: *Molecular Mechanics – Poisson Boltzmann Solvent Area*
NF- κ B – Fator nuclear kappa-B
PDB – Banco de dados de proteínas
PI3-K – Cinase fosfatidilinositol 3
RANK - Receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B
RMSD – Raiz do desvio quadrático médio

RNA_m – RNA mensageiro
SAS – Superfície acessível ao solvente
TACI – Ativador transmembranar que interage com CAML
THD – Domínio homólogo da TNF
TMD – Domínio transmembranar
TNF – Fator de necrose tumoral
TNF-R – Receptor do fator de necrose tumoral
TRAF – Fator associado a receptor de TNF
TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
TWEAK – Indutor fraco de apoptose relacionado a TNF
TWE-PRIL – Proteína de fusão TWEAK-APRIL
 ΔG – Variação da energia livre
 $\Delta\Delta G$ - Variação da variação da energia livre

Agradecimentos

Tenho muito a agradecer a todas as forças, sejam elas quais forem, chamadas de Deus ou natureza. Obrigado pela inspiração e por terem ajudado, fazendo as coisas acontecerem, mesmo que por caminhos não exatamente convencionais e fáceis.

A todos com os quais tive o prazer de aprender e trabalhar, na Universidade Federal do Rio de Janeiro e na Fiocruz. Só tenho a agradecer pela vivência que obtive nesses anos de experiência acadêmica e científica.

Agradeço a minha mãe e a minha irmã, por estarem aguentando uma barra, praticamente sozinhas. Aguentem firme que estarei mais presente depois que essa fase passar.

Ao Antonio, que tem sido o maior apoio nessa caminhada. Não tenho como expressar o quanto sou grato pela compreensão da minha ausência em vários momentos, ou então por precisar abrir mão de um monte de outras coisas por conta do trabalho.

Ao Ernesto, meu orientador, que se tornou um grande amigo. Foi um prazer enorme poder contar com toda a sua experiência ao longo do mestrado e doutorado. Se eu conseguir aproveitar 1% do que você me ensinou ao longo desses anos, já me sinto realizado, tamanho foi o aprendizado ao seu lado. Desculpe-me se esse aproveitamento não foi 100%, como eu gostaria. Será um prazer continuar essa jornada contando com sua colaboração nessa nova fase que iniciará em minha carreira.

Agradeço também ao Savino, pela sugestão do projeto e por todas as dicas e sugestões dadas ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Por muitas vezes essas pequenas dicas resolveram problemas enormes.

Ao Prof. Paulo Bisch, por ter me acolhido de braços abertos no Laboratório de Física Biológica da UFRJ no momento em que eu me preparava para o sanduiche. Obrigado por ter me deixado tão à vontade e por ter estimulado a continuidade desse trabalho. Agradeço também pela confiança durante esse período e por ter se mostrado aberto a futuras colaborações, que tenho certeza que virão.

Ao Dr. Michael Hahne, por ter me recebido em seu laboratório no Instituto de Genética Molecular, em Montpellier. Obrigado pelo tempo dispendido em me explicar todas as técnicas que foram utilizadas durante esse projeto e por ter auxiliado enormemente no desenho experimental da segunda parte desse trabalho.

Flávia Calmon e Cecília Rocha, vocês não sabem o quanto foram importantes durante a minha estadia em Montpellier. Além de ter um pouco de calor humano durante o inverno francês, sua ajuda na transposição da burocracia francesa foi inestimável. Cecília, sorte aí em Paris, tudo de melhor pra você!

Flávia, tudo de bom na sua carreira, que está indo de vento em popa, eu sei ☺

À equipe do Laboratório de Biologia da TNF, de Montpellier: Leticia, Claire, Rachel, Virginie.

Aos meus amigos do grupo de modelagem molecular do PROCC, Amanda Sutter, começando a sua carreira (ainda dá tempo de desistir!!!!!!) ☺, Amanda Maia, que fez vários comentários críticos na parte experimental do trabalho, Franklin, Milene e a todo o grupo de alunos e pesquisadores do PROCC.

A todo o pessoal do PROCC: Carlos, Elaine, Aline. Foi ótimo ter vocês como colegas.

A Ana, secretária do PROCC, eficientíssima e simpaticíssima. Se todas as secretárias fossem como você, seria bem mais fácil lidar com a burocracia que tanto atrapalha.

A toda a equipe do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo. Déa, Juju, Eliane, Dani, Leandra, Ingo, Désio e o pessoal da antiga, e a toda uma nova geração de alunos que sou incapaz de listar os nomes.

Ao grupo do Laboratório de Física Biológica, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Leandro (filogeneticista evolucionista biofísico pesquisador, mas é do bem), Maíra, Daniel, Beatriz (me espera para o café!), João, Gustavo, Pedro, Gilberto, Manu, Paulo Ricardo, que será um futuro colega na Fiocruz, Mauricio, Mainá... Valeu pela troca de conhecimentos, pelas contribuições e pela ajuda em todos os momentos. Desejo muita sorte e determinação a vocês. Também agradeço ao grupo do Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular, do Prof. Pedro Pascutti, pelas constantes discussões e pelo aprendizado.

À secretaria acadêmica do IOC, pela organização e esclarecimento de todas as dúvidas surgidas durante o período em que fui aluno da BCM.

Ao Dr. Carlos Alves, pela revisão crítica da tese.

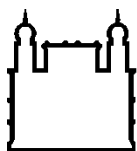
Aos membros da banca, por terem gentilmente aceitado o convite para participar da avaliação desse trabalho.

É bastante provável que eu tenha esquecido alguém, me desculpem!!!

“The computer was born to solve problems that did not exist before.”
– *Bill Gates*

“That's what makes Linux so good: you put in something, and that effort multiplies. It's a positive feedback cycle.”
– *Linus Torvalds*

“Tell me and I forget. Teach me and I remember. Involve me and I learn.”
– *Benjamin Franklin*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Identificação e validação de antagonistas potenciais de APRIL através da aplicação de cálculos de energia livre e dinâmica molecular

Resumo

TESE DE DOUTORADO

João Hermínio Martins da Silva

O ligante APRIL (do inglês: *A Proliferating Inducing Ligand*) foi descrito pela primeira vez por Hahne *et al*, em 1998, e inicialmente caracterizado pela sua capacidade de estimular a proliferação de células tumorais *in vitro*. Atualmente, três receptores para APRIL são conhecidos: *B-Cell Maturation Antigen* (BCMA), *Transmembrane Activator and CAML Interactor* (TACI), os quais são expressos principalmente por linfócitos B, e *Heparan Sulphate Proteoglycan* (HSPG). BCMA e TACI também são capazes de se ligar ao ligante *B-Cell Activation Factor* (BAFF), outra proteína da família TNF que compartilha uma alta similaridade estrutural com APRIL. Recentes descrições de camundongos deficientes em APRIL mostraram que essa proteína não é essencial para a manutenção da homeostase do sistema imune saudável, estando associada somente à proliferação de células tumorais, enquanto BAFF é um fator de sobrevivência fundamental para a maturação de linfócitos B. Dessa maneira, como BAFF é um fator crucial para o funcionamento do sistema imune, bloquear a interação de BAFF irá afetar a homeostase imunológica, comprometendo a imunidade do indivíduo.

O objetivo desse trabalho é gerar uma série de peptídeos antagonistas de APRIL, combinando ferramentas computacionais e experimentais. Através da combinação de “*Alanine Scanning*” computacional com cálculo de energia livre utilizando “*Linear Interaction Energy*” (LIE) nos complexos APRIL-TACI e BAFF-TACI, foi possível determinar a importância de cada resíduo na estrutura de TACI, apontando a contribuição energética individual para a especificidade da ligação APRIL-TACI. Os coeficientes padrão de LIE foram utilizados. A partir dos resultados de LIE, foram desenhados seis peptídeos mutados, tendo TACI como modelo, com potencial atividade inibitória para APRIL, sem interferir com a estrutura de BAFF:

T8: CRKELLKIFYDHLLLEDCISCANICGQHPRQCAYFC

T9: CRKEQFKIFYDHLLDDCISCAQICGQHHPHQCAYFC

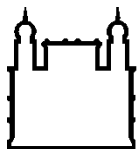
T10: CRKEQFKIFYDHLLDDCISCAQTCGQHHPHQCAYFC

T11: CRKEQFKIFYDELLEDDCISCAQICGQHHPHQCAYFC

T12:CRKELFKFYDHLLEDDCISCAQTGQHHPHQCAAYFC
T13:CRKELFKFYDHLLEDDCISCAQSCYQHHPHQCAAYFC

A estabilidade dos peptídeos foi analisada por dinâmica molecular em complexo com os dois ligantes, APRIL e BAFF, através da avaliação da estrutura secundária ao longo de 30 nanossegundos, quantificação das ligações hidrogênio e pontes salinas, e medição da superfície acessível ao solvente.

Após a dinâmica molecular, os melhores candidatos foram escolhidos em função do aumento do número de pontes de hidrogênio e pontes salinas formadas com APRIL. Os peptídeos T12 e T13 foram excluídos devido à perda da estrutura secundária inicial. Os quatro melhores candidatos, do ponto de vista computacional, foram clonados em bactérias e os plasmídeos foram transfectados em células eucarióticas 293T. Seguiu-se então a purificação do sobrenadante produzido pelas células transfectadas. O sucesso da transfecção foi confirmado por *imunoblotting*. A atividade inibitória desses peptídeos foi testada por ELISA após a purificação. Dentre os quatro peptídeos, dois foram capazes de reduzir sensivelmente a densidade ótica, indicando que houve efeito inibidor para esses peptídeos. Os resultados apontam que a estratégia elaborada nesse trabalho pode ser aplicada ao desenho de sequências peptídicas direcionadas à inibição de um alvo proteico específico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Identificação e validação de potenciais antagonistas da APRIL através da aplicação de cálculos de energia livre e dinâmica molecular

Abstract

PhD Thesis

João Hermínio Martins da Silva

The APRIL ligand (*A Proliferating Inducing Ligand*) was first described by Hahne *et al*, in 1998 and, initially, was characterized by its capacity of stimulate the proliferation of tumor cells *in vitro*. Currently, three APRIL receptors are known: *B-Cell Maturation Antigen* (BCMA), *Transmembrane Activator and CAML Interactor* (TACI), which are expressed mainly by B cells, and *Heparan Sulphate Proteoglycan* (HSPG). BCMA and TACI are also capable of bind to the ligand *B-Cell Activation Factor* (BAFF), another TNF family protein, sharing a high structural similarity with APRIL. Recent descriptions of knock-out mice for APRIL showed that this protein is not essential for the homeostasis of health immune system, while BAFF is a fundamental survival factor, directly related to the maturation of B cells. Thus, as BAFF is a crucial factor for the physiology of B cells, blocking the interaction of BAFF with TACI or BCMA could interfere with the immune homeostasis, compromising the individual immunity. The objective of this work is to generate a set of APRIL antagonist peptides, combining computational and experimental approaches. Through the combination of computational “*Alanine Scanning*” with free energy calculations employing “*Linear Interaction Energy*” (LIE) in the APRIL-TACI and BAFF-TACI complexes, we determined the importance of each residue in TACI structure, pointing the individual energetic contribution for the specificity of the APRIL-TACI binding. Taking these results as a start point, we proposed six mutated peptides, based on TACI structure, specifically designed to the blockage of APRIL, without interfering with BAFF activity.

T8: CRKELLKFYDHLLEDCCISCANICGQHPRQCAAYFC
T9: CRKEQFKFYDHLLEDCCISCAQICGQHHPQCAAYFC
T10: CRKEQFKFYDHLLEDCCISCAQTCGQHHPQCAAYFC
T11: CRKEQFKFYDELLEDCCISCAQICGQHHPQCAAYFC
T12: CRKELFKFYDHLLEDCCISCAQTCGQHHPQCAAYFC
T13: CRKELFKFYDHLLEDCCISCAQSCYQHHPQCAAYFC

The stability of these peptides was analyzed using molecular dynamics in complex with APRIL and BAFF ligands, by the evaluation of the secondary structure along the 30 nanoseconds of simulations, as well as quantification of hydrogen bonds and salt bridges, and measurement of the solvent accessible surface.

After the molecular dynamics, the four best candidates were selected, by the computational point of view. The T12 and T13 peptides were excluded due to the loss of secondary structure. These candidates were cloned in bacteria and the plasmids were transfected in 293T eukaryotic cells. The cells supernatant was purified and the transfection was tested by ELISA. Among the four peptides, two were able to inhibit selectively the APRIL expression, according to the decrease of optical density. The results indicate that the elaborated strategy can be applied to the design of peptide sequences directed to the inhibition of a specific protein target.

1. Introdução

1.1. Papel biológico das proteínas da família do Fator de Necrose Tumoral

Nesse trabalho, associamos diversas abordagens computacionais, como ferramentas para o desenho de inibidores peptídicos da proteína *A Proliferation Inducing Ligand* (APRIL) (Hahne, Kataoka *et al.*, 1998), associada ao desenvolvimento de linfomas, carcinoma de cólon e autoimunidade, dentre outras condições patológicas. As técnicas computacionais foram utilizadas visando a um melhor entendimento da estrutura de APRIL, assim como da especificidade das interações encontradas na interface proteica desse ligante com seus receptores, buscando características moleculares capazes de proporcionar a construção de peptídeos com melhor especificidade que os receptores naturais.

Os membros da família do TNF (do inglês *Tumor Necrosis Factor*) desempenham um papel crucial na regulação da sobrevivência celular. A família das proteínas TNF, atualmente é composta por cerca de 20 ligantes e mais de 25 receptores diferentes, envolvidos na regulação de processos biológicos essenciais que incluem, dentre outros, a proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular. (Bossen, Ingold *et al.*, 2006) Os membros dessa superfamília não são expressos em procaríotos, leveduras ou nematoides, estando representados por um único membro entre os insetos. (Brandt, Dionne *et al.*, 2004)

Através de eventos de duplicação, essa família se expandiu nos vertebrados, observação confirmada pela detecção de 20 genes relacionados com a sua expressão em humanos e camundongos. (Bossen, Ingold *et al.*, 2006) Em aves e mamíferos, a maioria dos membros das superfamílias TNF e de Receptores de TNF (TNF-R) está envolvida no desenvolvimento, manutenção e função de células do

sistema imune e no funcionamento de órgãos linfoides secundários, participando também em outras funções, como homeostase óssea.(Locksley, Killeen *et al.*, 2001)

Os ligantes da família TNF são proteínas transmembranares tipo II, com um domínio extracelular homotrimérico C-terminal, frequentemente secretado como uma citocina solúvel após processamento proteolítico.(Bodmer, Schneider *et al.*, 2002) A linfotóxina β foge a esse padrão, no sentido de não formar homotrímeros, mas sim heterotrímeros com a linfotóxina α . Os ligantes da família TNF foram descritos, ainda, com capacidade de se ligarem a um, dois ou mais diferentes receptores e vice versa. O membro “*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*”, por exemplo, promove a reabsorção óssea, através da estimulação da maturação dos precursores de osteoclastos pela ligação do receptor RANK, associado à membrana.(Tanaka, Nakamura *et al.*, 2005)

Os receptores de TNF são normalmente proteínas de membrana do tipo I e algumas vezes do tipo III. Alguns exemplos são o Antígeno de Maturação de Células B (do inglês, *B-Cell Maturation Antigen*, BCMA), Ativador Transmembranar que interage com CAML (do inglês *Transmembrane Activator and CAML Interactor*, TACI) e Receptor de BAFF (do inglês *BAFF Receptor*, BAFF-R). São ainda caracterizados pela presença de um a quatro domínios ricos em cisteína (do inglês *Cysteine Rich Domain*, CRD) na sua porção extracelular. Esses receptores, com múltiplos CRD, adotam uma estrutura alongada e ligam-se na junção entre dois monômeros formadores de um trímero, enquanto os receptores com um único CRD são mais compactos e se ligam a um único monômero em um ligante trimérico (figura 1).(Hymowitz, Christinger *et al.*, 1999; Liu, Hong *et al.*, 2003; Hymowitz, Patel *et al.*, 2005) Normalmente, um ligante trimérico se liga a três receptores monoméricos,

sendo esse um evento chave para a ativação de cascatas de sinalização intracelular.

Dados experimentais relativos às interações entre os receptores e ligantes da família TNF em humano e camundongo e, mais especificamente, dirigidos à reatividade cruzada, são escassos na literatura, sendo baseados em experimentos cujos resultados não são diretamente comparáveis (ELISA ou Ressonância Plasmônica, que apresentam sensibilidade e especificidade distintos), ou com reagentes específicos, seguindo protocolos modificados.

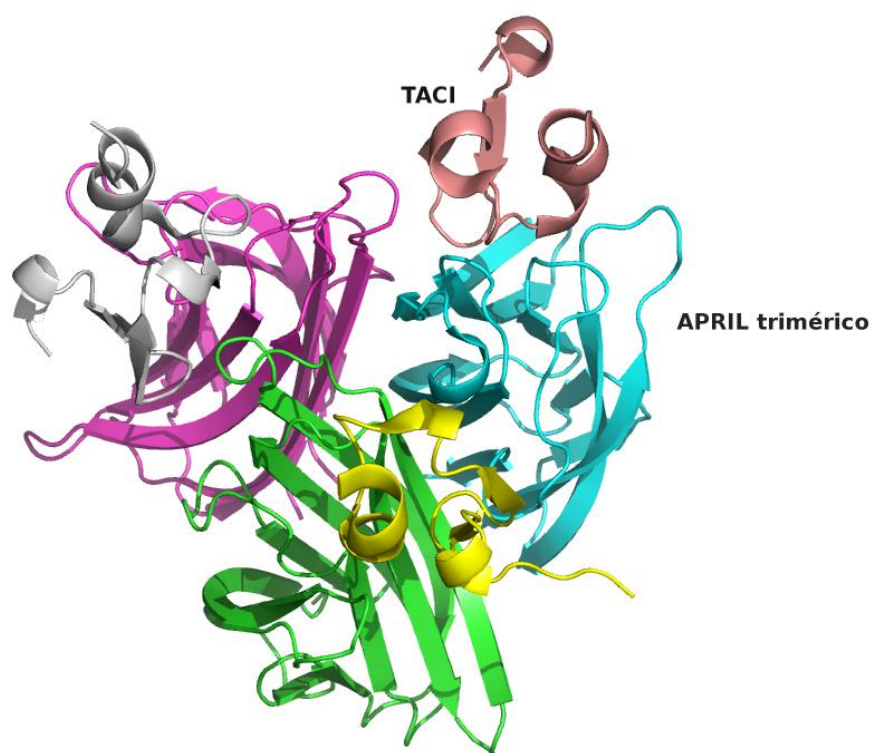


Figura 1 - Estrutura geral da família TNF, exemplificada pela molécula APRIL (ligante). Em azul, magenta e verde, os monômeros agrupados, formando a estrutura trimérica. Em cinza, amarelo e marrom, regiões de moléculas de TACI (receptor) ligadas entre os monômeros de APRIL. A estrutura geral da família TNF segue este padrão trimérico. Figura criada a partir da estrutura cristalográfica 1XU1, utilizando o programa *Pymol* (Schrodinger, 2010).

O ligante *A Proliferation Inducing Ligand* (APRIL) é capaz de ativar alguns fatores de transcrição através do recrutamento de *Fatores Associados a Receptores de TNF*

(do inglês *TNF Receptor Associated Factor*, *TRAF*). A especificidade das interações necessárias para a ativação desses fatores ainda não foi completamente elucidada, embora, através de ensaios *in vitro*, pareça que BCMA ligue-se a TRAF1, 2 e 3 e TACI ligue-se a TRAF 2, 5 e 6, levando à ativação da via canônica NF- κ B, assim como outros fatores de transcrição, incluindo p38, AP-1/JNK, MAPK, ERK e PI3-K/AKT.(Hatzoglou, Roussel *et al.*, 2000; Xia, Treanor *et al.*, 2000) As circunstâncias sob as quais os diferentes fatores de transcrição são ativados ainda não são bem compreendidas.

1.2. As proteínas “Ligante Indutor de Proliferação” (APRIL) e “Fator de Ativação de Células B” (BAFF) como alvos terapêuticos

A expressão alterada dos membros da família TNF está frequentemente associada a situações patológicas. Nesse sentido, vários membros da família de ligantes de TNF têm sido utilizados como alvos potenciais de fármacos para o tratamento de disfunções imunes, câncer e outras doenças.(Kurzrock, Rosenblum *et al.*, 1985; Aggarwal, Shishodia *et al.*, 2002) O ligante do tipo TNF, APRIL foi descrito pela primeira vez por Hahne e colaboradores em 1998 e citado pela sua capacidade de estimular a proliferação de células tumorais *in vitro* e *in vivo*.(Hahne, Kataoka *et al.*, 1998) A expressão do RNAm de APRIL em tecidos humanos sadios é restrita aos leucócitos, enquanto há uma super-expressão em tecidos tumorais, tais como certos linfomas e carcinomas do cólon.(Dillon, Gross *et al.*, 2006)

Também foi descrita a relação de APRIL com a tumorigenicidade em células 3T3-NIH (fibroblastos murinos) injetadas em animais imunodeficientes.(Hahne, Kataoka *et al.*, 1998) Por outro lado, o papel de APRIL na estimulação da proliferação de

linfócitos B1 e na produção de imunoglobulina A (IgA) é importante.(Kimberley, Van Bostelen *et al.*, 2009a) De maneira análoga, o crescimento de carcinomas que expressam APRIL de maneira endógena, injetados *in vivo*, pôde ser bloqueado por um receptor solúvel de APRIL.(Dillon, Gross *et al.*, 2006) .

Os resultados descritos no parágrafo anterior sugerem que APRIL esteja associada ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores, assim como leucemia linfóide crônica (LLC). Recentemente foi mostrado em camundongos transgênicos que APRIL favorece a formação de neoplasias em linfócitos B1 durante o envelhecimento.(Planelles, Carvalho-Pinto *et al.*, 2004) Este fenômeno assemelha-se à LLC humana já que as duas doenças desenvolvem-se durante o envelhecimento como consequência de uma lenta expansão da população de linfócitos B CD5+. De fato, detectou-se um aumento do nível de APRIL solúvel no soro dos pacientes afetados por LLC.(Planelles, Castillo-Gutierrez *et al.*, 2007)

Descrições recentes sobre camundongos deficientes para APRIL mostraram que esta proteína não é essencial para a manutenção do sistema imune sadio (Dillon, Gross *et al.*, 2006), embora esses animais apresentem uma deficiência na expressão de Imunoglobulina A (IgA) circulante. Desde então, APRIL tem sido postulada como mediadora da mudança de classe de IgG para IgA, especificamente via TACI. Esta característica, bem como as evidências experimentais do papel de APRIL no favorecimento das leucemias, sugere fortemente que APRIL possa ser um alvo em potencial para tratamentos terapêuticos, bloqueando o desenvolvimento dos tumores. APRIL parece também estar relacionada à sobrevivência de linfócitos B ativados na medula óssea.(Belhoue, Pihlgren *et al.*, 2008)

Por outro lado, o ligante BAFF é um fator de sobrevivência fundamental para os linfócitos B maduros e em maturação, como também para a resposta humoral.

Embora BAFF possa se ligar a um receptor exclusivo, denominado *BAFF receptor-3* (BR3), cuja expressão foi detectada em células T ativadas e células T reguladoras (Mackay e Leung, 2006), dois outros receptores, TACI e BCMA, são compartilhados por BAFF e APRIL (figura 2), com diferentes afinidades. BCMA liga-se com afinidade aproximadamente 1000 vezes maior a APRIL (Pelletier, Thompson *et al.*, 2003), enquanto TACI liga-se com igual afinidade a APRIL e BAFF, embora dados originários de diferentes experimentos tenham apresentado valores de afinidade discrepantes. Ambos os receptores são expressos em linfócitos B, enquanto TACI também foi detectado em um subconjunto de linfócitos T ativados. Porém, como BAFF é um fator crucial para manter a homeostase dos linfócitos B, a ação de bloquear essa interação também afetará esse processo e conseqüentemente a imunidade do indivíduo. Animais transgênicos para BAFF exibem uma alta expressão de linfócitos B que levam à autoimunidade, assim como animais deficientes para BAFF revelam um papel não redundante de BAFF na maturação de linfócitos B. (Khare, Sarosi *et al.*, 2000; Yu, Boone *et al.*, 2000)

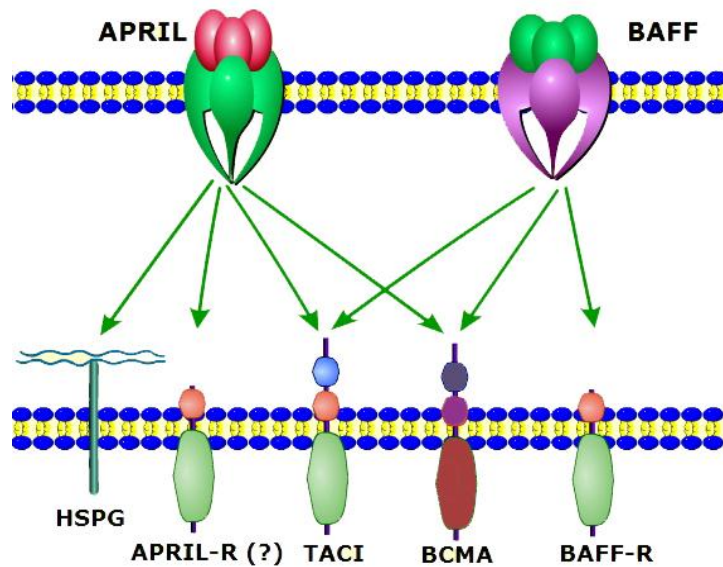


Figura 2 – Especificidade de APRIL e BAFF e seus receptores: TACI, BCMA, BAFF-R, *Heparan Sulfate Proteoglycan* (HSPG) e o hipotético receptor de APRIL. Figura modificada a partir de (Dillon, Gross *et al.*, 2006)

Desde sua descrição inicial, quando sua expressão foi associada à proliferação de tumores, outros estudos sugeriram a participação de APRIL na imunidade humoral. Embora compartilhe os mesmos receptores, a função de APRIL é distinta do papel de BAFF. (Dillon, Gross *et al.*, 2006; Kimberley, Hahne *et al.*, 2009) Ainda que APRIL e BAFF sejam capazes de estimular a sobrevivência de linfócitos B *in vitro*, estudos recentes sugerem papéis distintos dos dois ligantes na proliferação celular nos linfomas. De maneira similar, sugere-se que a interação de APRIL com HSPG e TACI seja crítica para a proliferação de células de mieloma múltiplo, caracterizado pela alta expressão de HSPG sindecán-1. (Moreaux, Sprynski *et al.*, 2009)

A clara associação de ambos os ligantes, APRIL e BAFF, no desenvolvimento ou prognóstico de doenças com distintas etiologias (Planelles, Carvalho-Pinto *et al.*, 2004; Planelles, Medema *et al.*, 2008; Kimberley, Medema *et al.*, 2009; Roosnek, Burjanadze *et al.*, 2009) levou ao estudo detalhado dos mecanismos moleculares de interação dessas proteínas. Várias estratégias foram elaboradas para gerar

antagonistas que bloqueiem a ação de ligantes da família de TNF. Nesse contexto, os antagonistas de maior sucesso são os bloqueadores de TNF que impedem o desenvolvimento da artrite reumatóide.(Steinman, 2004)

O desenvolvimento de antagonistas peptídicos de citocinas foi igualmente descrito.(Sun, Feng *et al.*, 2006) Atualmente, dois anticorpos monoclonais, assim como uma proteína de fusão entre o receptor de TNF p75 e o fragmento FC de IgG1 humana (Etanercept), são utilizados para tratar os pacientes acometidos por artrite (Jarvis e Faulds, 1999). Um fármaco, composto pelo receptor solúvel TACI-fc foi desenvolvido comercialmente (Atacicept) e se encontra na fase II/III de testes clínicos para o tratamento de algumas doenças autoimunes e desordens de linfócitos B. Os testes preliminares se mostraram eficazes no tratamento de autoimunidade, atingindo APRIL e BAFF simultaneamente.(Gatto, 2008) Entretanto, podem existir casos onde o direcionamento terapêutico a somente um dos ligantes seja uma estratégia mais adequada. A administração de atacicept por um longo período, como demonstrada usando um camundongo transgênico para TACI-fc, causa depleção na população madura de linfócitos B. Portanto, em casos onde APRIL desempenha um papel predominante, seria interessante o desenvolvimento de um fármaco que atue especificamente sobre esse ligante.(Schneider, Takatsuka *et al.*, 2001)

Outro medicamento, desenvolvido com o objetivo de bloquear a progressão de doenças autoimunes e tumores associados a linfócitos B, chamado Belimumab, atua diretamente sobre BAFF e também se encontra sob testes clínicos (Navarra, Guzman *et al.*, 2011). Entretanto, a atuação de BAFF no desenvolvimento de linfócitos B pode limitar o uso desse medicamento, já que potencialmente poderia levar à depleção de linfócitos B maduros.(Gross, Dillon *et al.*, 2001) Nesse contexto,

o desenho de fármacos específicos para APRIL será de grande valia para o tratamento dessas doenças.

O fato de receptores de TNF atuarem como trímeros torna ainda mais desafiador o desenho de um inibidor específico que interaja entre dois dos três monômeros que compõem esse trímero. Recentemente foi proposta a construção de um peptídeo trímérico tendo por base o CD40L.(Fournel, Wieckowski *et al.*, 2005) Essa construção se mostrou eficiente e capaz de ligar-se entre as fendas formadas entre os pares de monômeros componentes do trímero, aumentando consideravelmente a eficácia dos peptídeos elaborados como agonistas de CD40.

1.3. Estrutura dos genes que codificam APRIL e BAFF

A estrutura global do gene de APRIL é similar à do gene de BAFF. Entretanto, APRIL não forma “60-meros” encontrado em BAFF, mas apresenta resíduos próximos ao sítio de processamento da furina, no exon 3, que são cruciais para a ligação de glicosaminoglicanas (figura 3). APRIL é capaz de se ligar a glicosaminoglicanas (GAG) sulfatadas em sítios independentes dos sítios utilizados por outros receptores.(Hendriks, Planelles *et al.*, 2005; Ingold, Zumsteg *et al.*, 2005) A relevância do sítio de ligação em GAG não é clara, mas especula-se que pode servir para acumular ou multimerizar APRIL na matriz extracelular ou na superfície de células que expressem a proteoglicana sulfatada sindecan (Kimberley, Van Bostelen *et al.*, 2009b).

Embora seja expressa como uma proteína transmembranar, APRIL é clivada no complexo de Golgi por uma furina-convertase e secretada em sua forma solúvel, como um homotrímero.

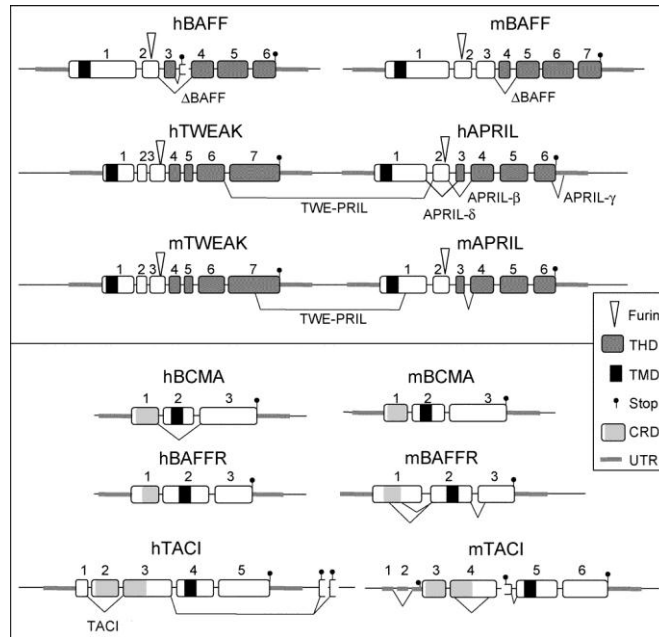


Figura 3 – Organização genômica de BAFF, APRIL e seus receptores. A)BAFF e APRIL. B)BAFF-R, BCMA e TACI. Os exons são representados por caixas e estão em escala. O tamanho dos introns e das porções não traduzidas dos exons não estão em escala. O produto do splicing alternativo é mostrado. As isoformas produzidas por *splicing* alternativo foram encontradas através da varredura do banco de dados NCBI para sequências EST não redundantes. Furin: sítio de clivagem da furina. THD: *TNF homology domain*. TMD: *transmembrane domain*. Stop: *stop codon*. CRD: *cysteine-rich domain*. UTR: regiões 5' e 3' não traduzidas. Adaptado de (Bossen e Schneider, 2006).

Nos genomas humano e murino, o gene de APRIL é localizado imediatamente a 3' do Indutor de apoptose relacionado a TNF (do inglês *TNF-related weak inducer of apoptosis*, TWEAK), outro ligante da família TNF. Um *splicing* intergênico entre o exon 6 de TWEAK e o exon 2 de APRIL é capaz de gerar TWE-PRIL humano.(Kofschoten, Pradet-Balade *et al.*, 2003) Embora o RNAm de TWE-PRIL seja expresso tão abundantemente quanto o RNAm de APRIL em células T e várias outras linhagens celulares (Pradet-Balade, Medema *et al.*, 2002), ainda não há “*expressed sequence tags*” (EST) no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) referentes a essa junção, enquanto EST que codificam APRIL são relativamente abundantes. A abundância e a relevância funcional dessa forma, composta por um domínio extracelular de APRIL e um domínio transmembranar de TWEAK, ainda não estão esclarecidas.(Pradet-Balade,

Medema *et al.*, 2002) Em todo o caso, EST que codificam TWE-PRIL murino estão presentes em duas formas: com ou sem Ala120.

A origem de TWE-PRIL murino é muito diferente do seu ortólogo humano, já que esse híbrido utiliza sítios de *splicing* dentro do exon 7 de TWEAK e dentro do exon 1 de APRIL. Apesar dessa diferença, ambos TWE-PRIL contêm o domínio *TNF homology domain* (THD) de APRIL inteiro, e apresentam a mesma especificidade para o receptor como APRIL. Embora TWE-PRIL tenha dois sítios de clivagem para furina-convertase, TWE-PRIL humano é resistente a esse processo.(Pradet-Balade, Medema *et al.*, 2002; Gavin, Ait-Azzouzene *et al.*, 2003)

1.4. Semelhanças e diferenças estruturais entre APRIL e BAFF

APRIL e BAFF compartilham aproximadamente 33% de identidade entre suas sequências, porém sua similaridade estrutural é notável, com a raiz do desvio quadrático médio (*root mean square deviation*, RMSD) de menos de 1Å, tendo como referência os C α do alinhamento estrutural entre ambas as sequências.

Todos os domínios ricos em cisteína dos receptores de APRIL e BAFF, incluindo ambos os domínios de TACI, compartilham uma sequência comum, o chamado motivo DXL, que consiste em uma sequência conservada de seis resíduos (Phe/Tyr/Trp)-Asp-Xaa-Leu-(Val/Thr)-(Arg/Gly). Este motivo é necessário para a ligação de APRIL e BAFF com seus receptores.(Gordon, Pan *et al.*, 2003; Patel, Wallweber *et al.*, 2004) As estruturas cristalográficas de BAFF ligado a BCMA, BR3 ou a um peptídeo apresentando o motivo DXL em um grampo β , mostram que esse motivo se liga em uma cavidade hidrofóbica e interage com dois resíduos de Arg conservados na superfície de BAFF.(Gordon, Pan *et al.*, 2003; Kim, Yu *et al.*, 2003;

Liu, Hong *et al.*, 2003) A estrutura isolada de APRIL, estruturalmente similar a BAFF, como elucidada por difração de raios-X, indica que o sítio de ligação a DXL é conservado nos dois ligantes.(Wallweber, Compaan *et al.*, 2004; Zhang, 2004) Desse modo, um modo de interação similar, via DXL é esperado para os complexos APRIL-receptor. De qualquer forma, a especificidade de BR3 e BCMA parece ser determinada por interações fora desse motivo.(Gordon, Pan *et al.*, 2003; Liu, Hong *et al.*, 2003; Patel, Wallweber *et al.*, 2004) A presença de íons Mg^{2+} coordenados por GlnA:234, GlnB:234 e AsnA:243 é notável em BAFF. O sítio de coordenação de íons metálicos formado pelos resíduos listados provavelmente desempenha um papel na estabilização do trímero.(Oren, Li *et al.*, 2002) É possível observar que a ligação entre o resíduo GlnB:234 presente nos dois monômeros é intercalada por um íon Mg^{2+} , assim como a interação da cadeia lateral de AsnA:243 com o oxigênio da cadeia principal de AsnB:235. A sobreposição estrutural de APRIL com BAFF revela diferenças significativas entre os laços D e E (figura 4). As diferenças situadas nessa região, em BAFF, são observadas também quando comparado com outros homólogos, como $TNF\alpha$, $TNF\beta$, CD40L, TRAIL e RANKL.

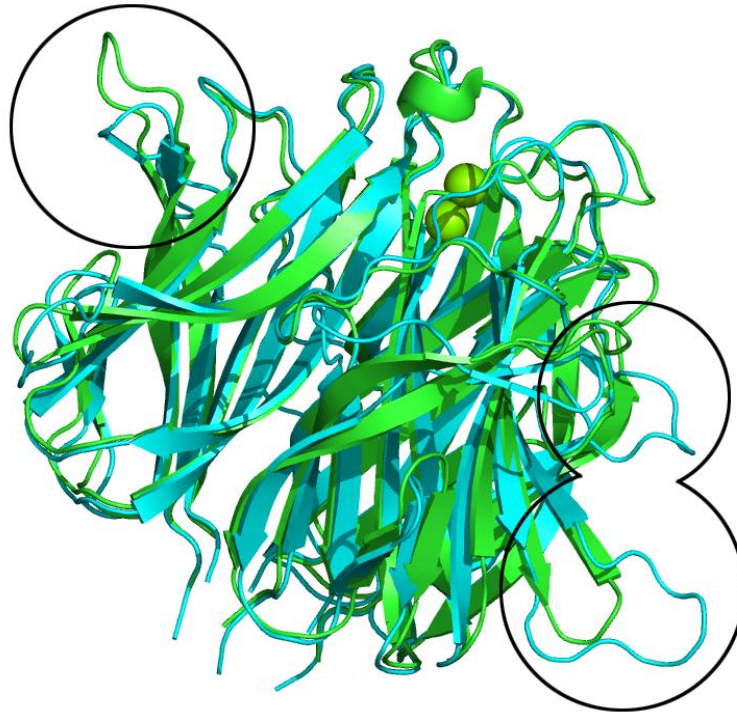


Figura 4 – Sobreposição das estruturas tridimensionais de APRIL (azul) e BAFF (verde). Nota-se em destaque a diferença no posicionamento dos loops “DE” localizados entre as folhas beta D e E em ambas as estruturas. Os íons Mg^{2+} estão representados em esferas de van der Waals na cor verde. Figura criada no Pymol, a partir da sobreposição das estruturas cristalográficas de APRIL (PDB:1XU1) e BAFF (PDB:1KXG).

O monômero de APRIL adota uma estrutura tipicamente observada na família TNF, denominada “*jelly roll*”. Os resíduos que formam a superfície de reconhecimento dos receptores se encontram em monômeros adjacentes. Destes resíduos, alguns são compartilhados também por APRIL, no reconhecimento de seus receptores: Leu133, Arg137, Thr183, Leu184, Phe185, Arg186, Ile188, Leu210, Asp214 e Phe235.(Oren, Li *et al.*, 2002) Em resumo, as estruturas de APRIL e BAFF revelam semelhanças notáveis em seu sítio de ligação, localizado na fenda situada entre dois monômeros contíguos. As diferenças nessa região permitem que citocinas discriminem receptores intimamente relacionados, como BCMA, TACI e BR3. A região conservada parece reconhecer motivos comuns entre esses receptores, enquanto a região variável, formada pelas alças, conferiria a especificidade do reconhecimento

entre essas três proteínas.(Oren, Li *et al.*, 2002) Estes dados mostram que um receptor modificado por mutamutênese sitio-dirigida capaz de fazer distinção entre uma ou outra citocina deve manter a estrutura tridimensional global compartilhada por TACI, BCMA e BR3, alterando somente os resíduos específicos para o reconhecimento.

1.5. Afinidades experimentais entre TACI/BCMA e APRIL/BAFF

Informações experimentais divergentes sobre afinidades entre os ligantes APRIL e BAFF e seus respectivos receptores TACI/BCMA e TACI/BAFF-R foram obtidas por ressonância plasmônica de superfície e ensaios imunoenzimáticos em diversos trabalhos, conforme ilustrado na tabela 1.

Tabela 1 – Afinidade calculada entre APRIL/BAFF e receptores.

Ligante	Receptor	Ensaio	Afinidade	Concentração (nM)
APRIL	BAFF-R	Biacore(Day, Cachero <i>et al.</i> ,	K _D	Não detectado
APRIL	BCMA	Biacore(Day, Cachero <i>et al.</i> ,	K _D	16
APRIL	BCMA	ELISA(Patel, Wallweber <i>et al.</i> ,	IC50	6
APRIL	TACI	Biacore(Hymowitz, Patel <i>et al.</i> ,	IC50	11
APRIL	TACI _s	Biacore(Hymowitz, Patel <i>et al.</i> ,	IC50	6
APRIL	BAFF-R	ELISA(Patel, Wallweber <i>et al.</i> ,	IC50	Não detectado
APRIL	BCMA	Biacore(Patel, Wallweber <i>et al.</i> ,	Afinidade aparente	0,2
BAFF	BAFF-R	ELISA(Gordon, Pan <i>et al.</i> ,	IC50	92
BAFF	BAFF-R	Biacore(Day, Cachero <i>et al.</i> ,	KD	16
BAFF	BCMA	ELISA(Patel, Wallweber <i>et al.</i> ,	IC50	8000
BAFF	BCMA	Biacore(Patel, Wallweber <i>et al.</i> ,	KD	Não detectado
BAFF	BCMA	Biacore(Day, Cachero <i>et al.</i> ,	KD	1600
BAFF	TACI	Biacore(Hymowitz, Patel <i>et al.</i> ,	IC50	1
BAFF	TACI _s	Biacore(Hymowitz, Patel <i>et al.</i> ,	IC50	2
BAFF	BAFF-R	ELISA(Patel, Wallweber <i>et al.</i> ,	IC50	7
BAFF	BAFF-R	Biacore(Day, Cachero <i>et al.</i> ,	Afinidade aparente	<0,03
BAFF	BCMA-	Biacore(Patel, Wallweber <i>et al.</i> ,	Afinidade aparente	5
BAFF	BCMA-	Biacore(Day, Cachero <i>et al.</i> ,	Afinidade aparente	0,6

Adaptada de (Bossen e Schneider, 2006) IC₅₀: Medida quantitativa da concentração necessária de um fármaco ou outra substância para inibir um processo biológico (ou componente dele), pela metade. KD: Constante de dissociação: constante de equilíbrio que mede a propensão de um complexo molecular em se dissociar reversivelmente em componentes menores. Fornece a dimensão

da concentração livre de um componente "A", quando metade do total de moléculas "B" está complexado com "A".

A determinação das afinidades precisas de APRIL e BAFF por seus receptores não é uma tarefa simples devido ao fato de as medidas calculadas com a proteína dimérica acoplada à Ig estarem sujeitas a efeitos significativos e imprevisíveis de avidéz (forças de múltiplas interações combinadas), capazes de aumentar a afinidade aparente. A variável avidéz, por sua vez, pode ser removida pelo uso de receptores monoméricos. No geral, o consenso é de que BAFF liga-se a BAFF-R e TACI com afinidades de ordem nanomolar e duas ou três ordens de magnitude mais fracas quando ligado a BCMA.(Bossen e Schneider, 2006) APRIL, por outro lado se liga a TACI e BCMA com alta afinidade (11 e 16 nM, respectivamente), mas não se liga a BAFF-R. Quando os receptores são dimerizados na forma de proteínas de fusão, todos se ligam eficientemente a seus ligantes em escala nanomolar. Em comparação, a interação de APRIL com HSPG é fraca (20-80 μ M).(Kimberley, Van Bostelen *et al.*, 2009b) A capacidade de BAFF endógeno sinalizar através de BCMA *in vivo* é desconhecida, mas certamente depende de efeitos de avidéz.(Day, Cachero *et al.*, 2005)

1.6. Desenho Racional de Fármacos baseado em estrutura

A abordagem denominada "desenho racional de fármacos"(Greer, Erickson *et al.*, 1994), parte do pressuposto de que o conhecimento da estrutura proteica, assim como das interações entre o receptor e o ligante, pode oferecer indícios de quais interações devem ser mantidas ou bloqueadas, visando à inibição da atividade biológica específica, ou ainda sua ativação, dependendo do efeito desejado.

Além da conformação ativa do complexo receptor-ligante, é interessante conhecer detalhadamente as interações existentes entre ambos, examinando minuciosamente a estrutura tridimensional do alvo. Essa análise permite que as interações relevantes sejam mantidas, ao mesmo tempo modificando o ligante ou o receptor, fazendo-o interagir mais especificamente, possivelmente ocupando sítios secundários, resultando em maior potência e especificidade. A partir da estrutura do complexo, é possível avaliar também a relação estrutura/atividade de compostos existentes, sugerir novos análogos e desenvolver novos conceitos e ideias para a síntese de novos ligantes, antes de sua síntese biológica ou clonagem.(Greer, Erickson *et al.*, 1994)

As técnicas computacionais utilizadas nesse trabalho (Linear Interaction Energy (LIE), *Alanine Scanning* computacional, Dinâmica Molecular, Identificação virtual de *hot spots*) já são estabelecidas e padronizadas.(Aqvist e Marelius, 2001; Morrison e Weiss, 2001; Kortemme, Kim *et al.*, 2004; Moreira, Fernandes *et al.*, 2007) Uma vez conhecendo-se a estrutura tridimensional das proteínas em estudo, podem-se estudar em detalhes as interações intra e intermoleculares e também inferir valores aproximados de energia livre, utilizando-se distintas técnicas.

1.7. Interações Proteína-Proteína

O reconhecimento molecular, entre substratos ou ligantes e receptores, por exemplo, é fundamental em muitos processos bioquímicos e frequentemente é utilizado para a transferência de energia ou informação. Esse reconhecimento pode ser complexo, envolvendo não somente as interações de van de Waals e eletrostáticas, como também a contribuição do solvente originada da blindagem

dielétrica ou do efeito hidrofóbico. A especificidade da interação envolve a liberação do solvente do sítio de ligação e pode ser seguida de rearranjo conformacional em uma ou ambas as moléculas, assim como a liberação ou captação de íons.(Gilson, Given *et al.*, 1997; Fersht, 1999)

A interação entre diferentes interfaces proteínas é sensível a mutações em aminoácidos individuais. Já foi discutida a contribuição energética efetiva de poucos aminoácidos em uma interface proteína-proteína.(Clackson e Wells, 1995) Mesmo em proteínas com uma interface de interação contendo superfícies grandes e complexas, poucos resíduos participam diretamente do reconhecimento molecular. Essa região, chamada de epítipo funcional é delimitada por uma pequena área na superfície de contato. A esses resíduos, com participação direta, dá-se o nome de “*hot-spots*”, enquanto os resíduos com participação indireta são chamados de “*warm-spots*”. Energeticamente, um “*hot-spot*” é definido como um aminoácido cuja mutação por alanina causa um aumento na energia livre de ligação de, pelo menos, 4 kcal/mol, enquanto “*warm-spots*” são definidos como aminoácidos cuja diferença de energia livre de ligação ao serem mutados por alanina, varia de 2 a 4 kcal/mol.(Pons, Rajpal *et al.*, 1999) Os aminoácidos que não sofrem variação significativa de energia, ($\Delta G < 2$ kcal/mol) ao serem mutados por alanina são denominados nulos ou neutros. Estatisticamente, valores diferentes de ΔG podem ser considerados, dependendo principalmente da metodologia empregada para o cálculo de energia livre de ligação.(Pons, Rajpal *et al.*, 1999)

Os resíduos que constituem os “*hot-spots*” estão relacionados à conservação estrutural em sítios específicos e normalmente são ricos em arginina, triptofano e tirosina, embora outros aminoácidos também estejam presentes.(Hu, Ma *et al.*, 2000) Os “*hot-spots*” já foram estudados em diversas interfaces proteína-proteína e

normalmente não estão dispersos na superfície de contato. Pelo contrário, existe a tendência de que esses resíduos se agrupem em nichos, formando uma densa rede de contatos e contribuindo cooperativamente para a estabilidade do complexo.(Hu, Ma *et al.*, 2000; Keskin, Ma *et al.*, 2005)

Uma das consequências biológicas sobre essa observação é a inacessibilidade do esqueleto peptídico à mutação sitio-dirigida. O esqueleto peptídico representa aproximadamente 1/5 da área da interface de contato e ainda assim contribui com aproximadamente 2/3 das ligações de hidrogênio.(Lo Conte, Chothia *et al.*, 1999)

Outra justificativa para o tamanho reduzido dos epitopos funcionais é que os átomos que permanecem parcialmente acessíveis ao solvente, constituem 3/4 da área de interface, e quando removidos, por exemplo ao serem mutados por alanina, podem ser substituídos por moléculas de água, com um custo energético muito menor que átomos totalmente enterrados. Também já foi mostrado que a inacessibilidade ao solvente é uma condição necessária para um resíduo constituir um “*hot-spot*”.(Bogan e Thorn, 1998; Lo Conte, Chothia *et al.*, 1999; Arkin, Randal *et al.*, 2003) Além disso, a presença de cavidades ou sulcos próximos a *hot spots*, faz dessas regiões boas candidatas para o desenho de fármacos. A avaliação dessas regiões, juntamente com a análise da identidade sequencial pode auxiliar no controle da especificidade da interação proteína-inibidor.(Hancock, Macias *et al.*, 2006)

Bogan and Thorn notaram que os *hot spots* tendem ainda a se concentrar no centro das interfaces.(Bogan e Thorn, 1998) Essa observação levou à criação de uma hipótese chamada de “*O’ring*”, onde a região que envolve o *hot spot* seria formada por resíduos hidrofóbicos, propiciando a formação de interações produtivas. No entanto, levando-se em conta o papel crucial da hidratação, esse padrão poderia

indicar que os átomos da cadeia lateral na periferia são mais facilmente substituídos por água, sem romper a ligação do que átomos no centro da interface de ligação.(Delano, 2002)

1.8. Abundância dos diferentes aminoácidos em proteínas

De acordo com os dados levantados em uma análise de 45.137 proteínas dentre 15 taxons, os aminoácidos não polares Ala e Leu são os mais abundantes, enquanto os menos abundantes são Trp e Cys (figura 5).(Jordan, Kondrashov et al., 2005) Em uma análise posterior, em um conjunto de dados definido por interfaces proteína-proteína com dados experimentais de *alanine scanning* disponíveis em bancos de dados públicos ou na literatura, a distribuição se mostrou diferente, com uma prevalência de resíduos carregados e Tyr (figura 6).(Lise, Archambeau et al., 2009)

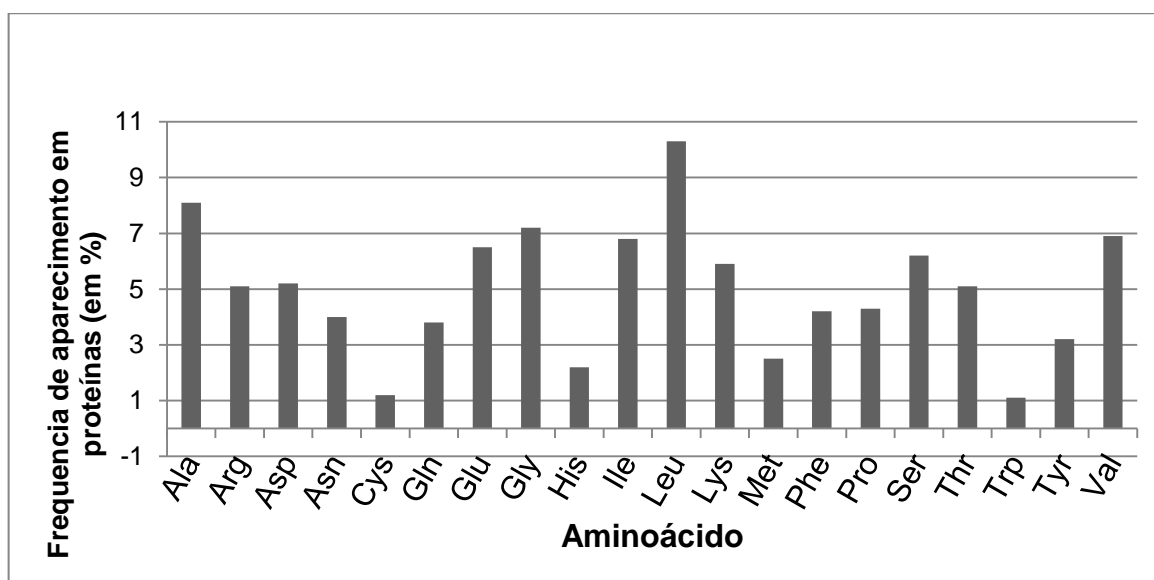


Figura 5 – Distribuição dos aminoácidos em diferentes proteínas. Análise de prevalência dos aminoácidos mais comuns em um conjunto de 45.137 proteínas de 15 diferentes táxons. Adaptado de Jordan, Kondrashov et al., 2005.

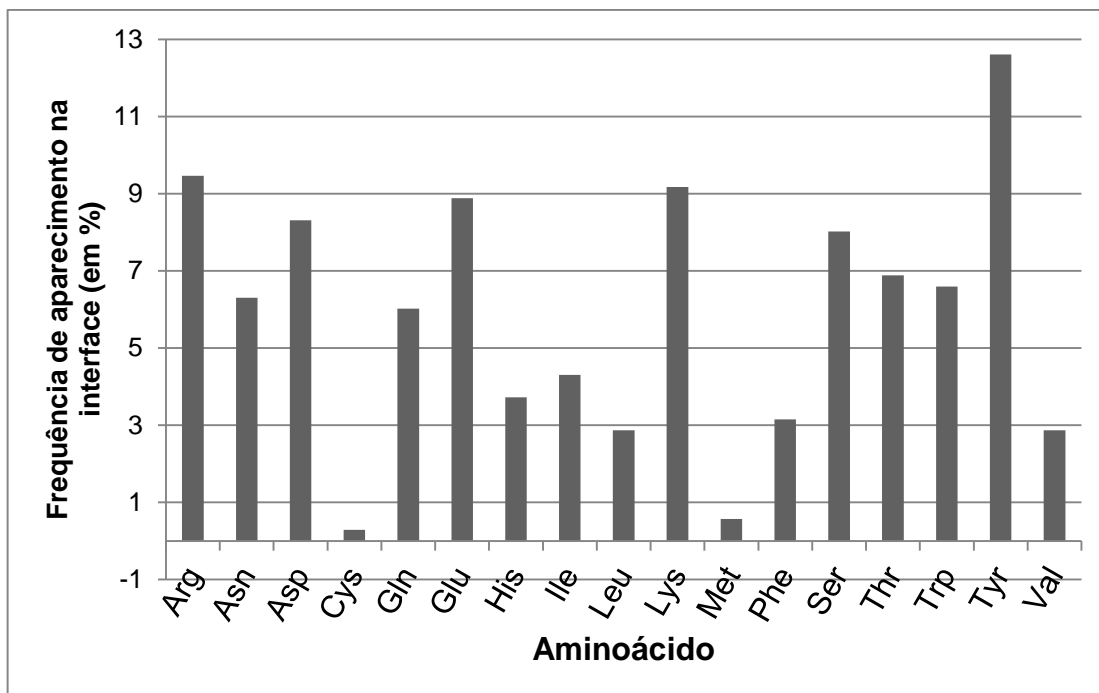


Figura 6 – Distribuição dos aminoácidos presentes em diversas interfaces proteicas. Prevalência de aminoácidos levantados de um conjunto de interfaces proteicas que apresentam dados experimentais e computacionais de *alanine scanning*.

Restringindo ainda mais o conjunto de dados, é possível mostrar a distribuição de aminoácidos que se localizam na interface proteica e mais comumente fazem parte de um *hot-spot* (figura 7). (Lise, Archambeau et al., 2009)

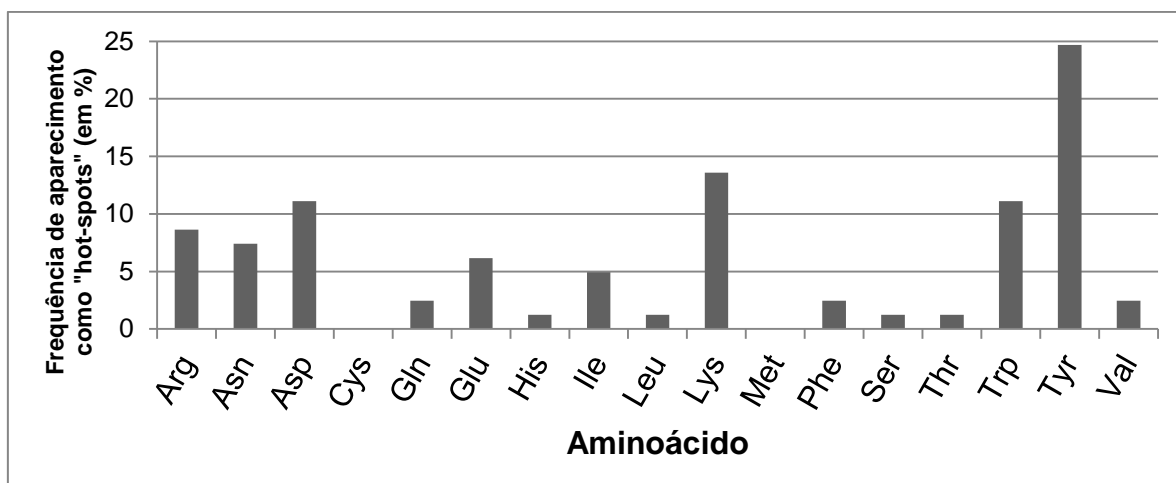


Figura 7 – **Frequência de aminoácidos presentes na interface proteica e que compõem *hot spots***. Adaptado de Lise, Archambeau et al., 2009. Os resíduos Tyr, Trp, Lys, Arg, Asp e Glu aparecem mais frequentemente em *hot spots*.

Assim, é possível identificar os resíduos com maior abundância dentre os “*hot-spots*” enumerados, cujos dados experimentais estejam disponíveis publicamente. Observamos também que, além dos aminoácidos carregados, aparecem ainda Tyr, Trp e Asn com uma frequência relativa similar a estes.

1.9. Bloqueio de interações proteína-proteína

O uso de compostos químicos visando o bloqueio de interações proteína-proteína vem despertando o interesse de diversos grupos e indústrias farmacêuticas que têm investido no desenho de fármacos específicos para complexos proteicos. (Walsh, 2005; Lampson e Kapoor, 2006) A correta identificação de proteínas apropriadas para a inibição (“drogáveis”) é um dos passos-chave para assegurar o sucesso no desenvolvimento de inibidores que atuem em interface proteína-proteína.

As superfícies dessas interfaces são raramente regulares. Em sua grande maioria, os sítios de ligação somente são expostos após a multimerização. (Bogan e Thorn, 1998; Toogood, 2002; Archakov, Govorun *et al.*, 2003; Arkin e Wells, 2004)

1.10. Mutagênese experimental por alanina

A mutagênese experimental por alanina é uma metodologia poderosa para a análise de interações em interfaces proteicas. Essa metodologia mede o efeito na afinidade de um complexo proteico produzido pela deleção da cadeia lateral do aminoácido, além do C β . A substituição sistemática de todos os aminoácidos de uma sequência por alanina é capaz de prover um mapa detalhado, informando quais interações são críticas e quais são menos relevantes. Clackson e Wells definiram esses resíduos importantes como “*hot spots*”, em trabalho pioneiro sobre a ligação do hormônio do crescimento ao seu receptor, onde somente uma pequena fração dos resíduos da interface contabilizava a maior parte da energia de ligação. (Clackson e Wells, 1995)

Experimentalmente, a técnica mais utilizada é o *shotgun alanine scanning* (figura 8). O *shotgun scanning* implementa um formato simplificado de *alanine scanning* combinatorial. Bibliotecas de proteínas cujos resíduos foram mutados por alanina são expressas na superfície de fagos para a seleção *in vitro*. Após sucessivas rodadas de seleção, são detectados resíduos que contribuem para a ligação, possivelmente substituídos por alanina. A combinação dos códons pode ser tetranomial, onde além do resíduo selvagem e alanina, outros dois aminoácidos podem ser também codificados. Atualmente, a síntese automatizada de DNA é usada para a geração de oligonucleotídeos codificantes para as bibliotecas de proteínas com resíduos mutados por alanina.

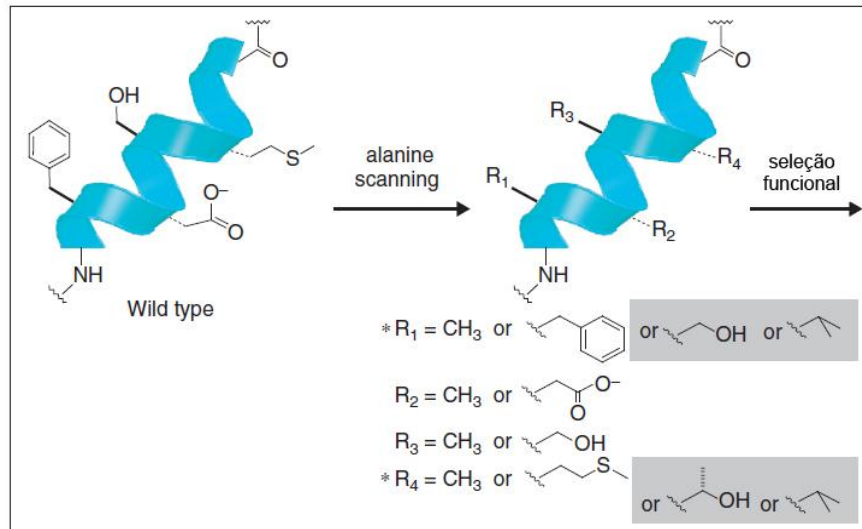


Figura 8 - Bibliotecas combinatoriais de substituição por alanina. Através de mutagênese sitio-dirigida, múltiplas substituições por alanina são introduzidas em uma proteína selvagem. Devido à degeneração do código genético, mais de um aminoácido pode ser introduzido em cada cadeia lateral mutada. É possível que até quatro resíduos distintos sejam gerados pela combinação dos códons. Adaptado de Morrison e Weiss, 2001.

Embora a mutagênese por alanina possa ser aplicada a complexos grandes, através de *phage display*, ainda representa um esforço experimental que não pode ser aplicado para análise de interações proteicas em larga escala. (Weiss, Watanabe et al., 2000) No sentido de transpor essa limitação, foram desenvolvidas técnicas computacionais capazes de reproduzir os resultados obtidos em um ensaio experimental, conforme será discutido no próximo tópico.

1.11. Alanine scanning computacional

Até o momento, os resultados computacionais em nível atômico não apresentaram a precisão necessária para alcançar a acurácia química, que atualmente é de ~1 kcal/mol. Essa acurácia é utilizada tradicionalmente como um padrão de correlação satisfatório entre resultados teóricos e experimentais.(Moreira, Fernandes et al., 2007) Assim, a taxa de sucesso no cálculo da energia livre do sistema após mutação por alanina tem sido modesta até agora. A mutação de aminoácidos carregados (Asp, Glu, Lys, Arg e His) gera resultados predominantemente em desacordo com os experimentais e o tempo computacional envolvido continua sendo alto.(Massova e Kollman, 1999; Reyes e Kollman, 2000; Wang e Kollman, 2000; Wang, Morin et al., 2001; Wang, Donini et al., 2001; Huo, Massova et al., 2002) Dessa maneira, uma abordagem computacional precisa representaria um avanço significativo quando comparado diretamente à relação custo/benefício apresentada por uma abordagem experimental, visando o cálculo das diferenças de energia livre de ligação.

A mutação de resíduos específicos em proteínas já foi demonstrada como uma ferramenta de grande importância para a determinação da contribuição energética individual (Hodges e Merrifield, 1974), assim como a força da rede de ligações de hidrogênio em interfaces proteicas.(Fersht, Shi et al., 1985)

As interações proteína-proteína são componentes-chave para todos os processos de transdução de sinal. O desenvolvimento e aplicação de métodos capazes de alterar racionalmente essas interações têm um papel importante na dissecção da função e conectividade em redes proteicas complexas. A predição energética da contribuição individual de cada resíduo é particularmente de grande valia na determinação de resíduos cruciais para o reconhecimento e sinalização molecular.(Tong, Drees et al., 2002)

A maioria das metodologias utiliza uma função de energia livre empírica para a estimativa de energia de ligação.(Sharp, 1998; Massova e Kollman, 1999; Guerois, Nielsen *et al.*, 2002; Huo, Massova *et al.*, 2002) Alguns trabalhos pioneiros se valeram ainda de resultados experimentais para direcionar suas observações.(Guerois, Nielsen *et al.*, 2002; Kortemme, Kim *et al.*, 2004) A abordagem dessas metodologias utiliza os parâmetros não-ligados encontrados em campos de força clássicos, como o potencial de Lennard-Jones e a energia eletrostática, definida pelo potencial de Coulomb. Alguns podem ainda implementar termos que definem a energia de dessolvatação, determinada por um modelo de solvatação implícito(Lazaridis e Karplus, 1999), a compensação da entropia do sistema(Zoete e Michielin, 2007) e ainda um termo orientacional para a descrição da rede de ligações de hidrogênio(Kortemme, Morozov *et al.*, 2003). A forma geral da função consiste em uma combinação linear desses potenciais.

Outros métodos mais sofisticados e custosos computacionalmente, como o *Molecular Mechanic - Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA), podem produzir resultados mais aproximados aos observados experimentalmente. O MM-PBSA, por exemplo, oferece uma estimativa mais acurada do efeito eletrostático em proteínas.(Massova e Kollman, 1999; Huo, Massova *et al.*, 2002). Como limitação, essas abordagens não levam em conta a mobilidade existente na interface proteica, considerando os membros isolados com a mesma estrutura, antes e após a formação do complexo. Consequentemente, as interações intramoleculares são as mesmas antes e após a formação do complexo e sua contribuição é cancelada no cálculo da energia livre. Sequer a movimentação observada nas cadeias laterais de aminoácidos é considerada. A energia eletrostática é uma exceção, pois a sua contribuição é dependendo do meio.

Já é consolidado o conhecimento de que a adaptação do ligante ao seu receptor envolve a movimentação de regiões ricas em laços, considerados mais móveis que as regiões com estruturas secundárias estáveis.(Spyrakis, Bidon-Chanal *et al.*, 2010; Zhuravlev e Papoian, 2010) Sabe-se também que várias regiões desordenadas podem se tornar ordenadas após a ligação, enquanto outras podem ainda se tornar mais flexíveis.(Forman-Kay, 1999) O ganho ou a perda de entropia associados a esses dois efeitos pode afetar significativamente a energia livre de ligação. Por último, cofatores, íons metálicos, moléculas de água intermediando ligações entre cadeias laterais na interface não são quantificados. A consideração da mobilidade proteica representaria um avanço considerável na estimativa da energia livre do sistema assim como na determinação precisa dos *hot spots*.

1.12. Métodos baseados no cálculo de energia livre

A predição da interação seletiva de moléculas com seus receptores, aptas a formar complexos estáveis, é um dos principais desafios em farmacologia e química medicinal.

Embora fatores cinéticos possam influenciar a afinidade em diferentes complexos moleculares em meio celular, o fator primário a ser considerado inicialmente no processo de reconhecimento molecular é a termodinâmica.(Gilson, Given *et al.*, 1997) Em particular, a constante de equilíbrio para a ligação entre dois estados A e B para a formação do complexo AB depende exponencialmente da mudança de energia livre associada à formação do complexo, conforme ilustrado na equação a seguir, onde G_B e G_A são as energias livres de dois estados B e A,

respectivamente, R a constante universal dos gases, T a temperatura e K_{eq} a constante de equilíbrio.

$$\Delta G = G_B - G_A = -RT \ln K_{eq}$$

Os métodos para o cálculo de energia livre usam uma amostragem conformacional para a geração de médias termodinâmicas, em contraste com os métodos de *docking*, que focam em uma única conformação. O uso de *ensembles* conformacionais é vantajoso já que remove a “sensibilidade” aos detalhes de uma única conformação. Por outro lado, os métodos de energia livre necessitam de maior poder computacional e maior tempo de cálculo, além de precisarem apresentar variedade conformacional. Basicamente, dois métodos de cálculo se destacam: métodos “*endpoint*”, que consideram somente o estado inicial (livre) e o final (ligado) e estimam a energia livre de ligação calculando a diferença entre os dois estados e métodos “*pathway*”, que computam a soma de pequenas diferenças ao longo de um caminho com um número pré-determinado de passos, conectando os estados inicial e final. (Zhou e Siegelbaum, 2008)

1.13. Energia de Interação Linear (LIE)

O método *Linear Interaction Energy* (LIE), proposto em 1994 (Aqvist, Medina *et al.*, 1994), baseia-se na aproximação da resposta linear eletrostática e na estimativa empírica da contribuição apolar (*van der waals*). Esse método emergiu como uma alternativa ao método *Free Energy Perturbation* (FEP) em muitos casos.

Em contraste ao FEP, o método LIE requer somente simulações das extremidades inicial e final do ciclo de perturbação termodinâmica, sem exigir transformações alquímicas. Essa técnica já foi aplicada na determinação da energia livre de ligação absoluta de vários ligantes. Sua primeira aplicação foi a avaliação de um conjunto de inibidores de endotiopepsina, cujos valores de energia livre absoluta foram determinados em concordância com os resultados experimentais.

Subsequentemente, o método também foi utilizado no estudo da ligação de inibidores à protease do HIV, tripsina, trombina humana, dentre outros. (Brandsdal, Aqvist *et al.*, 2001; Ljungberg, Marelius *et al.*, 2001; Carlsson, Boukharta *et al.*, 2008)

A energia livre de ligação é estimada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta G = \alpha \left(\langle U_{LJ}^{l-s} \rangle - \langle U_{LJ}^{l-w} \rangle \right) + \beta \left(\langle U_{el}^{l-s} \rangle - \langle U_{el}^{l-w} \rangle \right) + \gamma$$

onde os colchetes representam valores médios, LJ e el representam, respectivamente, as contribuições das energias de interação de *Lennard-Jones* e eletrostáticas do ligante com o seu entorno (l-s), obtidas por simulações de dinâmica molecular ou Monte Carlo. O símbolo Δ indica a mudança de estado do ligante, do estado não-ligado (em solução) para o estado ligado (em complexo).

As mudanças na energia interna do solvente e da proteína são multiplicadas pelos fatores de calibração empíricos α e β , (coeficientes de peso para os termos apolar e eletrostático, respectivamente) em face de sua energia de reorganização em resposta ao ligante.(Aqvist, Medina et al., 1994) Possivelmente, pode ainda ser incorporado um termo adicional, γ , que representa a mudança na entropia do sistema. As aplicações iniciais do método adotaram o valor 0,5 para β , de acordo com a aproximação da resposta linear, juntamente com um coeficiente de 0,16 para a contribuição polar e um valor nulo de gama. Investigações posteriores levaram à mudança de um coeficiente β refletindo as características do ligante, podendo assumir distintos valores: 0,5 para ligantes carregados, 0,43 para ligantes neutros com momento dipolar, 0,37 para ligantes neutros com uma hidroxila e 0,33 para ligantes neutros com duas ou mais hidroxilas. Os diferentes valores do coeficiente eletrostático foram obtidos após cálculos por FEP. Esse refinamento, de acordo com a carga e com o número de hidroxilas, tem como finalidade levar em conta os desvios da aproximação da resposta linear, que se mostram particularmente pronunciados para ligantes contendo grupos dipolares. Considerando esses valores como padrão, o coeficiente apolar ideal foi 0,181, e gama próximo a zero.(Hansson, Marelius *et al.*, 1998)

Outros estudos apontam a necessidade da aplicação de diferentes coeficientes, que levem ao consenso com os valores experimentais. É provável que os coeficientes sejam dependentes do sistema estudado, embora diferenças nos campos de força e nos procedimentos computacionais também sejam importantes.

Como publicado em 2006, boas correlações entre a energia livre calculada e resultados experimentais foram obtidas com os coeficientes padrão: $\alpha=0,18$ e $\beta=0,43$, além de coeficientes específicos para cada sistema.(Wang, Wang *et al.*,

1999) Em geral, um mesmo conjunto de coeficientes de calibração não pode ser aplicado para todos os sistemas.

A qualidade dos resultados gerados por LIE é significativamente alta, desde que respeitadas as condições normalmente utilizadas para a aplicação do método: estudo de ligantes semelhantes dentro de uma série de compostos, desconsiderando as mudanças na entropia configuracional e omitindo a energia interna do ligante. A característica mais promissora, no entanto, é a capacidade de calcular a energia livre de ligação absoluta, que normalmente foge do escopo de FEP.

Para cada estimativa de energia livre de ligação utilizando o método *linear interaction energy* (LIE)(Aqvist, Medina *et al.*, 1994) são necessárias duas simulações: uma delas com o ligante em solução e a outra com o ligante em complexo com o receptor. As amostras salvas durante as simulações representam conjuntos de conformações e são usadas para computar o potencial eletrostático médio e as energias de interação de *Lennard-Jones* do ligante com o seu entorno nos estados livre (em solução) e ligado (em complexo com o receptor e solvatado).

Um segundo método *endpoint* também largamente utilizado é o MM-PBSA. Esse método utiliza simulações de dinâmica molecular do ligante livre, do receptor livre e do complexo, como pontos iniciais para o cálculo das energias potencial e de solvatação.(Srinivasan, Miller *et al.*, 1998; Gouda, Kuntz *et al.*, 2003) A dinâmica molecular aplicada nesse método tipicamente faz uso de um campo de força empírico (assim como LIE) e um modelo de solvente explícito. As médias de energia potencial e energia de solvatação são calculadas sobre cada trajetória, permitindo que sejam conhecidas as mudanças na energia potencial e na energia de solvatação, de acordo com a equação a seguir:

$$\Delta G = \langle U_{pl} \rangle - \langle U_p \rangle - \langle U_l \rangle + \langle W_{pl} \rangle - \langle W_p \rangle - \langle W_l \rangle - T\Delta S^\circ$$

onde $\langle U_{pl} \rangle$, $\langle U_p \rangle$ e $\langle U_l \rangle$ são as médias do potencial do Boltzmann do complexo, do receptor e do ligante, respectivamente, $\langle W_{pl} \rangle$, $\langle W_p \rangle$ e $\langle W_l \rangle$ são as médias da energia de solvatação do complexo, do receptor e do ligante, respectivamente, T é a temperatura do sistema e ΔS° a contribuição entrópica para a ligação.

1.14. Racional e motivação

Tradicionalmente, os fármacos são descobertos através de varreduras aleatórias ou direcionadas, seguidas por uma otimização estrutural discreta, de modo a potencializar sua atividade. Com o aumento dos custos, diminuição de recursos e legislação cada vez mais estrita, essa abordagem não se mostra eficiente ou econômica.

A carência de dados relativos à afinidade e energia livre dos ligantes APRIL e BAFF e seus receptores, TACI e BCMA, nos levou a estudar mais detalhadamente esses complexos, visando a observação de padrões de ligação que pudessem ser utilizados no desenho de novos inibidores peptídicos complementares especificamente a APRIL. As simulações de dinâmica molecular e cálculo de energia livre realizadas nesse estudo foram conduzidas de maneira a avaliar e quantificar o perfil energético do complexo APRIL/TACI e propor racionalmente modificações estruturais em TACI, visando o aumento da afinidade entre estas proteínas.

A associação ao grupo que inicialmente descreveu a função dessa proteína da família TNF favoreceu a realização dos experimentos laboratoriais que propiciaram a comprovação parcial dos resultados obtidos.

2. *Objetivos*

2.1. Objetivo geral

O objetivo central deste trabalho é gerar uma plataforma estrutural peptídica altamente seletiva e específica para APRIL, no intuito de desenvolver agentes terapêuticos com aplicação potencial em doenças inflamatórias, autoimunes, particularmente artrite reumatoide, dada a correlação direta da expressão de APRIL em pacientes acometidos por essa doença e alguns tipos de câncer como, por exemplo, adenocarcinomas e linfomas.

Para desenvolver antagonistas específicos combinaremos metodologias computacionais e experimentais com o objetivo de produzir antagonistas solúveis para a molécula receptora da APRIL com base na estrutura de uma de suas moléculas receptoras, TACI. Tais antagonistas poderão ser usados para corrigir a sinalização em excesso da proteína APRIL como descrita para vários tipos de tumores. Além disso, níveis sorológicos aumentados da APRIL têm sido observados em pacientes com doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus, sugerindo que essa proteína poderia ser um alvo terapêutico no tratamento dessas enfermidades.

2.2. Objetivos específicos

- Construir a estrutura tridimensional de APRIL humana por modelagem comparativa
- Caracterizar as interações de APRIL e BAFF com seu receptor comum TACI_D2.
- Elaborar uma abordagem computacional para a avaliação da relevância dos resíduos de TACI na interação com APRIL e BAFF.
- Propor peptídeos mutados, baseados na sequência selvagem de TACI, com modificações capazes de inibir seletivamente a interação de APRIL.
- Realizar simulações de dinâmica molecular com os peptídeos desenhados e prever se haverá aumento na afinidade com a incorporação das mudanças propostas, levando à interação específica com APRIL e/ou BAFF.
- Sugerir, dentre as sequências desenhadas, potenciais candidatos para a clonagem e ensaios funcionais biológicos através de ensaio imunoenzimático.
- Expressar as sequências em vetor eucariótico e testá-las experimentalmente em sistemas de fase sólida.

3. Metodologia

O desenvolvimento de novos fármacos permanece ainda hoje como um desafio. Enquanto o tradicional processo de preparação e modificação de moléculas mostra-se como a mais bem sucedida abordagem com esse objetivo, o advento da simulação computacional em sistemas biológicos conduziu ao processo de desenho e descoberta de fármacos por uma nova via, potencialmente mais curta. O estudo teórico detalhado das interações moleculares vem se tornando cada vez mais eficaz e condizente com os resultados experimentais.

A partir do conhecimento aprofundado da estrutura e comportamento moleculares, é possível determinar as conformações mais prováveis dos fármacos no sítio de ligação, assim como fatores energéticos e estruturais responsáveis por interações ligante-receptor.

Discutiremos nesse capítulo as ferramentas utilizadas no estudo das interações dos ligantes APRIL e BAFF com o receptor TACI e as estratégias elaboradas para alcançar os objetivos propostos.

3.1. Modelagem Comparativa

Proteínas que não possuem estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente podem ter sua estrutura predita a partir da sua sequência de aminoácidos utilizando o método de modelagem comparativa, também conhecida como modelagem por homologia.(Sali e Blundell, 1993) Trata-se de um método empírico que se baseia no alinhamento construído entre a sequência da proteína a ser modelada e a sequência de uma proteína relacionada evolutivamente (homóloga) que possua estrutura tridimensional resolvida experimentalmente.

O processo de predição da estrutura tridimensional de uma proteína utilizando métodos de modelagem comparativa consiste em quatro etapas: I) identificação de referências; II) alinhamento entre sequências; III) construção do modelo; e IV) validação do modelo.(Marti-Renom, Stuart et al., 2000) Na modelagem comparativa é necessário construir o melhor alinhamento possível entre a sequência a ser modelada e a sequência escolhida como referência para ser utilizada como molde. A construção do modelo é baseada inteiramente na informação contida no alinhamento entre as sequências. A validação do modelo construído tem o objetivo de avaliar a qualidade do modelo, que determinará a precisão da estrutura tridimensional, indicando a sua possível utilização, e também identificar possíveis erros da estrutura tridimensional, resultantes da escolha inadequada das referências ou do alinhamento construído.(Eswar, Webb et al., 2006)

Neste trabalho, a estrutura da proteína APRIL humana foi obtida através de modelagem comparativa, tendo como molde a estrutura da proteína APRIL isolada de camundongo, depositada no Protein Data Bank (PDB) (Berman, Westbrook et al., 2000), sob código 1XU1 (Hymowitz, Patel et al., 2005), usando o programa Modeller versão 9.4.(Sali e Blundell, 1993) A sequência da APRIL humana foi obtida no banco de dados *Protein* do NCBI sob o código AAL90442.1.(Pradet-Balade, Medema et al., 2002) O alinhamento foi gerado pelo programa Align (Rice, Longden et al., 2000), utilizando a matriz de substituição Blosum62.(Henikoff e Henikoff, 1992). Foram construídos 50 modelos, dentre os quais o de menor valor de função objetiva foi escolhido para posterior validação. A função objetiva é calculada a partir das restrições geométricas e valores energéticos medidos durante a construção do modelo.(Sali e Blundell, 1993) A estrutura homotrimérica de APRIL complexada à proteína TACI foi obtida pelo alinhamento estrutural do modelo à estrutura do molde.

O mesmo procedimento não precisou ser realizado para BAFF, cuja estrutura correspondente à sequência humana se encontra depositada no PDB sob o código 1KXG.(Oren, Li et al., 2002)

3.2. Dinâmica molecular aplicada ao Cálculo de Energia Livre e análise da estabilidade dos peptídeos mutados

A Dinâmica Molecular (DM) é um método de simulação computacional que utiliza um campo de forças clássico para descrever as interações moleculares a partir da resolução numérica das equações clássicas de movimento. (Allinger, 1976; Allen e Tildesley, 1987; Leach, 2001)

Genericamente atribui-se a denominação de **campo de força** à descrição de um sistema de muitas partículas pela sobreposição de termos simples. Para o tratamento de centenas ou milhares de átomos, são introduzidas funções potenciais empíricas, calibradas por informações experimentais e cálculos quânticos sobre pequenas moléculas.(Brooks, Bruccoleri *et al.*, 1983; Brooks-III, Karplus *et al.*, 1988)

A função energia potencial para um sistema molecular constituído de N átomos calcula-se entre os pares de átomos a partir de somatórios de termos harmônicos, torcionais, eletrostáticos e de Lennard-Jones, forma funcional comum a vários campos de força (GROMACS, AMBER, CHARMM etc).

A solução numérica das equações de movimento a partir de coordenadas e velocidades iniciais, para o movimento de cada átomo submetido ao campo de força, é obtida através de um algoritmo computacional. Todos eles baseiam-se na resolução das equações de Newton a partir de uma expansão em série de potências da posição das partículas para cada partícula e em cada incremento no tempo δt .(Allinger, 1976; Leach, 2001)

A simulação por dinâmica molecular abre a possibilidade de um estudo mais detalhado dos sistemas de macromoléculas em complexo com outras moléculas menores, com análise das interações entre estes componentes na escala microscópica e em tempos da ordem de até microssegundos. Com esta metodologia simula-se o comportamento dinâmico dos sistemas, sendo possível o acompanhamento da evolução temporal dos mesmos como também a determinação de propriedades dinâmicas, estruturais e termodinâmicas, como a energia livre. (Leach, 2001) Assim como ocorre para os demais potenciais termodinâmicos, não são os valores absolutos da energia livre em si, mas as variações na referida energia que retêm importâncias mais significativas tanto em questões práticas como teóricas. A variação da energia livre de Gibbs, determinada via diferença entre as energias associadas ao estado final e inicial do sistema, dado ser a energia em questão uma função de estado $\Delta G = G_f - G_i$, sendo G_f a energia livre final e G_i a energia livre inicial.

Os complexos APRIL/TACI e BAFF/TACI foram submetidos a simulações de dinâmica molecular onde foi realizada a mutação por alanina em todos os resíduos de TACI, exceto Ala e Cys, totalizando 28 resíduos. A estrutura de APRIL humana foi mantida sem alterações. Dessa maneira, o complexo utilizado para o cálculo de energia livre é composto de dois monômeros de APRIL ou BAFF e uma molécula de TACI, já que o terceiro monômero não mantém interação direta com o receptor. Para essa fase do trabalho, utilizamos o programa Q. (Marelius, John, Kolmodin, Karin *et al.*, 1998) Inicialmente, realizamos 500 picossegundos (ps) de simulação à temperatura $T=200$ K e 500 ps à temperatura $T=300$ K, totalizando 1 nanossegundo (ns). Após a equilibração, realizamos mais 4 ns de simulação, completando a fase

de produção, aproveitando os 4500 ps finais para o cálculo da energia livre do sistema. As trajetórias foram salvas a cada 0,5 ps.

Uma maneira do programa Q lidar com o custo computacional elevado no cálculo do potencial eletrostático de longo alcance, devido à inclusão de condições periódicas de contorno, é confinar o sistema em uma esfera de raio delimitado, desconsiderando as interações não ligadas fora do raio dessa esfera. Essa abordagem reduz o número de partículas simuladas.(Marelius, J., Kolmodin, K. *et al.*, 1998)

A esfera delimitada para as simulações foi de 20 Å com centro no carbono alfa ($C\alpha$) de cada aminoácido de TACI. A biblioteca de fragmentos do campo de força Gromos96 (Daura, Mark *et al.*, 1998) utilizada no programa Q contém topologias para os resíduos Lys, Arg, Asp e Glu em sua forma neutra, mas mantém a topologia correspondente à forma ionizada. Nesse último caso, os aminoácidos Lys e Arg com a cadeia lateral com carga +1e se denominam (Ly+, Ar+), e os resíduos Asp e Glu com carga líquida -1e As-, Gl-. Os resíduos carregados, localizados até 10 Å do centro da esfera foram considerados na forma iônica, sendo os restantes neutros. Todos os resíduos situados até uma distância de 18,5 Å do centro da esfera externa foram mantidos sem restrições, enquanto os próximos até 1,5 Å da borda da esfera foram submetidos a restrições harmônicas com constante de força igual a 200 kcal/(mol.Å²).

A estabilidade do sistema foi calculada comparando os valores de energia média das duas metades da fase de produção, baseado no conceito de ineficiência estatística.(Allen e Tildesley, 1987)

Um exemplo do sistema montado para os cálculos de energia livre é mostrado na figura 9.

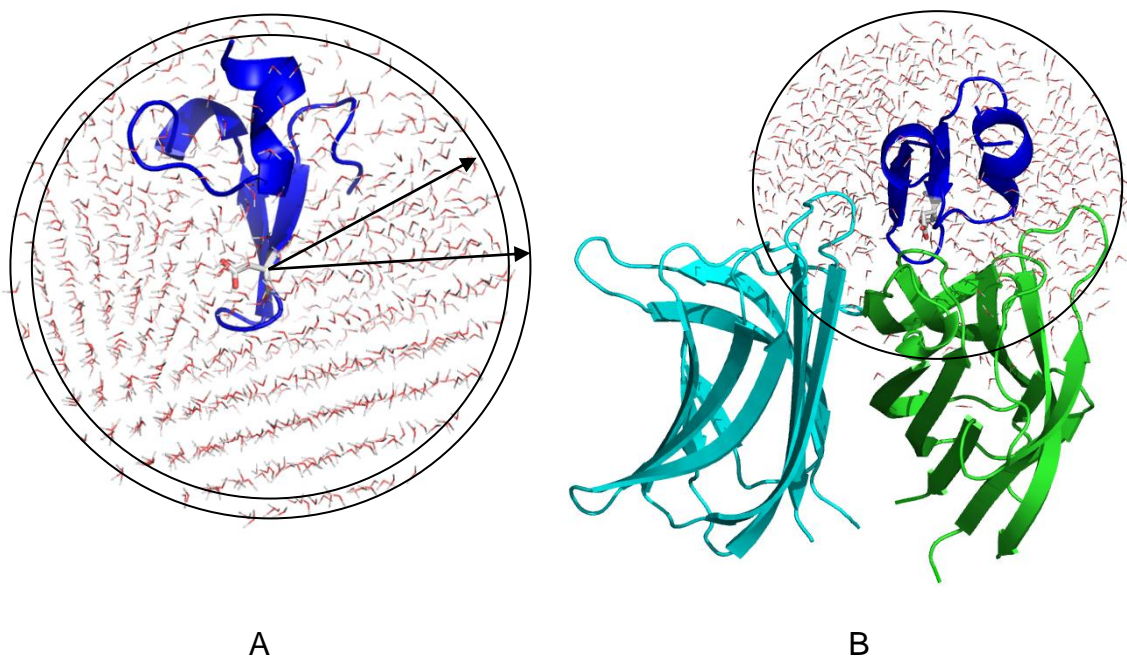


Figura 9 – Modelo representativo do complexo construído para os cálculos de energia livre. Em A, o sistema ligante+solvente. O resíduo representado por bastões no centro da esfera representa o ligante de referência. As setas indicam o raio externo da esfera, onde os átomos foram mantidos fixos por restrições harmônicas. Em B, o sistema ligante+receptor+solvente. As cadeias em ciano e verde representam dois monômeros de APRIL, enquanto a cadeia em azul representa TACI.

Para realizar os cálculos da variação da energia livre ($\Delta\Delta G$), são necessárias simulações de quatro sistemas distintos para cada resíduo de TACI: dois considerando a estrutura nativa: ligante + solvente e ligante + complexo; e dois para a estrutura mutada por alanina: ligante (mutado) + solvente e ligante (mutado) + complexo.

Os valores dos coeficientes de calibração para a equação de LIE foram os seguintes: 0,5 para resíduos carregados, 0,43 para resíduos neutros com momento dipolar e 0,37 para resíduos com uma hidroxila (Ser, Thr, Tyr). Os *hot spots* foram definidos por resíduos que exibem um $\Delta\Delta G$ positivo, quando mutados por alanina.(Moreira, Fernandes *et al.*, 2007)

O $\Delta\Delta G$ estimado foi calculado pela subtração do valor entre ΔG do ligante mutado e ΔG do ligante nativo ou selvagem.

$$\Delta\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta G_{\text{mutado}} - \Delta G_{\text{selvagem}}$$

Para os resíduos carregados, foi adicionado um termo de correção ao valor de $\Delta\Delta G$ igual a $1.35|\text{pH}-\text{Pka}|$, tendo o valor de pH 7.0 como referência e Pka 12,5, 10,7, 4,5 e 4,0, para os resíduos Arg, Lys, Glu e Asp, respectivamente. Assim, os valores de correção foram 7,43, 5,0, 3,38 e 4,05 para Arg, Lys, Glu e Asp, respectivamente. Esta correção compensa possíveis diferenças surgidas entre os resultados experimentais e os calculados (Qasim, Ranjbar *et al.*, 1995). A soma par a par, implementada para a redução da demanda computacional, desconsidera a influência exercida por mais de duas partículas simultaneamente, levando à exclusão de alguns efeitos de polarização do campo de força. Esse efeito é induzido pelo campo eletrostático de todo o sistema e é particularmente perceptível na cadeia lateral de resíduos ionizáveis.

O desvio padrão dos valores de $\Delta\Delta G$ foi calculado de acordo com a expressão:

$\sigma_{\text{total}} = \sqrt{\beta^2(\sigma_{\text{ligado}}^2(\text{el}) + \sigma_{\text{livre}}^2(\text{el})) + \alpha^2(\sigma_{\text{ligado}}^2(\text{LJ}) + \sigma_{\text{livre}}^2(\text{LJ}))}$, onde α e β correspondem aos coeficientes do LIE e $\sigma^{(x)}$ representa o desvio padrão para os termos nos estados ligado e livre.

3.3. Desenho de peptídeos com potencial capacidade inibitória para APRIL

Em função dos resultados do cálculo de energia livre por dinâmica molecular e de observações feitas na estrutura cristalográfica do complexo APRIL/TACI e

BAFF/TACI, mutamos direcionalmente a estrutura de TACI, dando origem a um conjunto de peptídeos que doravante serão denominados T0 a T13, correspondendo T0 à estrutura de TACI selvagem.

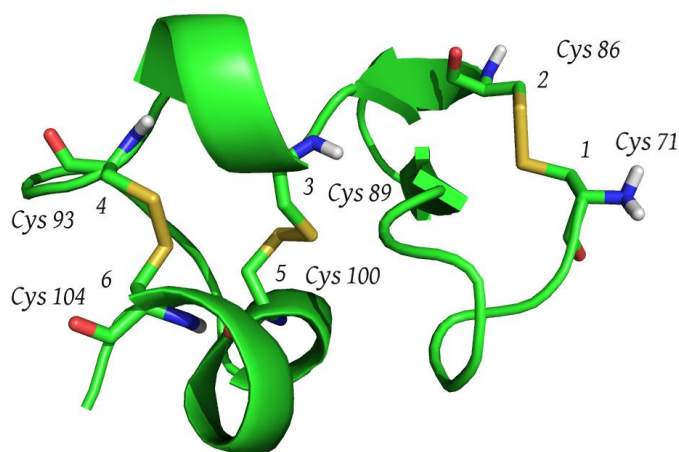
As escolhas de resíduos para as mutações recaíram em aminoácidos com cargas opostas, no caso de resíduos carregados, com $\Delta\Delta G$ positivo. Em outras situações, foi intencionado o aumento no comprimento da cadeia lateral, impelindo interações específicas, ou o aumento do número de ligações hidrogênio e pontes salinas pontuais. Também foi direcionado o aumento do efeito hidrofóbico ou redução da exposição ao solvente.

O programa utilizado para as simulações por Dinâmica Molecular dos complexos de APRIL/BAFF com os peptídeos mutados (T0-T13) foi o GROMACS.(Lindahl, Hess *et al.*, 2001) Inicialmente os complexos foram submetidos a 5000 passos de minimização, utilizando o algoritmo *steepest descent*, e as coordenadas finais da minimização foram aproveitadas como coordenadas iniciais da dinâmica molecular. A dinâmica foi dividida em duas partes: termalização, de 1 a 3 ns, compreendendo 1 ns a 100 K, 1 ns a 200 K e 1 ns a 300 K, mantendo a proteína com seus átomos pesados restritos por um potencial harmônico de constante 1000 kJ/(mol nm²), e a fase de produção, totalizando 30 ns a partir da termalização. O tratamento eletrostático utilizado em todas as fases foi *Particle Mesh Ewald* (PME).(Essmann, Perera *et al.*, 1995). Os raios de corte foram 0,9 e 1,4 nm, para o potencial eletrostático e de Lennard-Jones, respectivamente. Condições periódicas de contorno foram aplicadas. Os sistemas foram hidratados com o modelo de água SPC.(Berendsen, Postma *et al.*, 1981) O acoplamento térmico de Berendsen foi utilizado para manter a temperatura em 310K, com um tempo de relaxação de 10 fs e acoplamento de pressão de Berendsen isotrópico.(Berendsen, Postma *et al.*,

1984) O algoritmo LINCS foi utilizado para restringir os comprimentos das ligações covalentes.(Hess, Bekker *et al.*, 1997) As dimensões da caixa foram 0,9 x 0,9 x 0,9 nm³. O campo de força utilizado foi o Gromos96.(Daura, Mark *et al.*, 1998) Os parâmetros da dinâmica molecular e do cálculo de energia livre com Q, são mostrados no Anexo II.

3.4. Estrutura mínima de TACI necessária para interação do APRIL

Para as simulações de dinâmica molecular com TACI sob diferentes condições de clivagem das pontes dissulfeto, o aminoácido cisteína componente de cada ligação foi substituído por alanina. Com esse procedimento, foi possível formar diferentes combinações entre as três pontes existentes no domínio TACI-d2 (figura 10).



1: 71-86
2: 89-100
3: 93-104

Bridge

1	1	2	3
2			
3		2	3
4	1		3
5	1	2	
6		2	
7			3

Figura 10 – Pontes dissulfídicas presentes no domínio rico em cisteína de TACI. A: Existem três pontes S-S, formadas pelos resíduos C71-C86, C89-C100 e C93-C104 no estado nativo. B: Combinações de quebra de pontes dissulfídicas clivadas para o estudo da estabilidade da estrutura mínima de TACI. A combinação 1, mantendo as três pontes, é o controle positivo, enquanto a segunda combinação, eliminando as três pontes, o controle negativo.

O sistema 1 foi mantido como controle positivo, mantendo todas as pontes, enquanto o sistema 2 foi determinado como controle negativo, com todas as pontes clivadas. A mutação foi feita com o programa Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC) e a simulação obedeceu às mesmas condições da dinâmica molecular dos peptídeos T0-T13. O tempo de simulação para a análise da estrutura secundária foi de 30 ns.

3.5. Mutagênese computacional

Os resultados obtidos no cálculo da energia livre e a partir da análise da interface APRIL/TACI foram empregados como base para a mutagênese sitio-dirigida da estrutura de TACI. A estrutura inicial de TACI_D2 (T0), foi modificada usando o

programa Pymol, realizando as mutações sugeridas nos peptídeos T1 a T13, utilizando a ferramenta de mutagênese pontual. Os peptídeos mutados foram alinhados estruturalmente ao complexo APRIL-T0 e BAFF-T0, sobrepondo-se as coordenadas do carbono alfa dos resíduos dos peptídeos com T0, gerando as coordenadas iniciais para a minimização de energia e da dinâmica molecular partindo da mesma conformação inicial.

3.6. Superfície Acessível ao Solvente

A superfície acessível ao solvente (SAS) descreve a área sobre a qual um contato entre a molécula e o solvente pode ocorrer, considerando cada átomo como sua representação pelo raio de Van der Waals.(Lee e Richards, 1971) Com essa medida, é possível quantificar a área de uma biomolécula que fica exposta ao solvente.

A SAS foi calculada utilizando o programa NACCESS (Hubbard, Campbell *et al.*, 1991). Os resíduos acessíveis foram considerados como os que apresentaram um valor de SAS relativa de mais de 5%. O tamanho da sonda utilizada foi de 0,14 nm.

3.7. Clonagem e Expressão dos mutantes de TAC1

Foram realizados ensaios de PCR a fim de amplificar a fase aberta de leitura do gene de TAC1. Foi utilizado o vetor pDONR221 de 4762 pares de bases que é um plasmídeo com sítio múltiplo de clonagem e possui resistência ao antibiótico Kanamicina. Todos os construtos contêm sequências sinalizadoras de secreção e recombinação que permitem sua inserção no vetor de expressão. Depois de

realizada a ligação, foi misturada gentilmente metade do seu volume com a cepa de *E. coli* DH5 α sempre mantidas no gelo. Esta mistura foi transferida para cubetas de eletroporação e submetida a uma descarga elétrica de 2.5 V num eletroporador por no máximo 4.8 s. Após este tempo foi adicionado imediatamente 800 μ L de meio SOC condicionado a temperatura ambiente. O meio contendo as células transformadas foi removido e mantido sob leve agitação a 37°C por 1 h. Finalmente as células transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo o antibiótico adequado para posterior seleção dos clones positivos.

Todos os peptídeos foram baseados no domínio TACI-d2 e foram acoplados ao fragmento cristalizável (FC) da Ig. Duas combinações foram expressas: a primeira acrescentada do domínio TMD de TACI e a segunda sem esse domínio. Os iniciadores utilizados para essa fase do trabalho são descritos no anexo I. As sequências amplificadas por PCR foram submetidas e eletroforese em gel de agarose 7,5% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) para a purificação usando o kit de extração *QIAquick* (Qiagen, Courtaboeuf, France). Os peptídeos foram clonados usando o *Gateway LR Clonase Enzyme Mix* (Invitrogen). Os clones foram isolados, expandidos e os plasmídeos foram purificados usando o *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação dos plasmídeos, células 293T foram transfectadas com CaCl₂ e o sobrenadante produzido foi então recolhido e mantido a -20°C. A expressão dos peptídeos foi confirmada por Western Blot, usando anti-IgFC. O protocolo do PCR, assim como as sequências dos inicializadores utilizados, se encontra no anexo I.

3.8. Cultivo Celular

Células renais embrionárias humanas (HEK)/293T aderentes foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modificado (DMEM) contendo 200 mM de *GlutaMAX* (Gibco, France), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 10% soro bovino fetal (SFB). As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. As células foram mantidas em passagens sucessivas e ao atingirem 70% de confluência, a monocamada foi removida com a adição de PBS/EDTA 0.5 mM.

3.9. Transfecção

Aproximadamente 24 horas antes da transfecção, as células foram plaqueadas de maneira a estarem com cerca de 60% de confluência no momento da transfecção. As transfecções foram feitas em placas de seis poços adicionando 1,0 ng/ml de DNA em cada poço. As células foram transfectadas pelo método de CaCl₂. Em resumo, os plasmídeos foram diluídos em água e CaCl₂ 2,5 M foi adicionado. Em sequência, salina tamponada (HBS 2x pH 7.1) foi adicionado lentamente à solução. Foram então adicionadas, gota a gota, às células, mantendo a placa sob vagarosa agitação. Esta técnica se baseia nos precipitados de DNA plasmidial formados pela interação com os íons de cálcio. O precipitado insolúvel adere à superfície celular e é endocitado pelas células. Após 8 horas, o meio de transfecção foi trocado e a eficiência da transfecção foi analisada após 72 horas através de imunoblotting. O protocolo da transfecção se encontra no anexo I.

3.10. Imunoblotting

Após 72 horas, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 2000 RPM, seguido de filtração em filtro de 0,22 µM. Volumes iguais dos sobrenadantes foram adicionados

em gel desnaturante de poliacrilamida a 10%. Após a finalização da eletroforese, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose, conforme protocolo descrito. (Morel et al. 2002). As membranas foram incubadas com anticorpo anti-Flag produzido em coelho, seguido de anticorpo secundário produzido em cabra, anti-coelho acoplado a peroxidase (*horseradish peroxidase*) (Dako, Trappes, France). As membranas foram reveladas usando *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante.

3.11. ELISA

Para os ensaios imunoenzimáticos, (ELISA), padronizado previamente pelo grupo do Dr. Michael Hahne, placas de 96 poços Nunc Maxisorp (eBioscience, France) foram incubadas a 4°C *overnight*, com 100 µL/poço (20 ng/ml) de BCMA (Peprotech, France) ou TACI-FC (cedido pelo Dr. Michael Hahne), diluído no tampão de sensibilização e posterior incubação *overnight* a 4°C. Antes de ser adicionado à placa, 100 µl do sobrenadante recolhido das células expressando cada um dos peptídeos foram incubados em banho de gelo por 15 minutos, juntamente com 0,75 µl de APRIL-flag ou BAFF-flag. Após 2 horas de incubação 100 µl de anti-flag foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por mais 1 hora, seguida de lavagem com PBS-Tween (6x) e foi então adicionado *anti-flag*, seguida de mais 30 minutos de incubação a 4°C. Finalmente, o complexo imune foi revelado com adição de 100 µl da solução de revelação (O-Fenilenodiamina em tampão de lavagem), a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de ELISA a 490 nm. O protocolo do ELISA se encontra no anexo I.

4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão descritos:

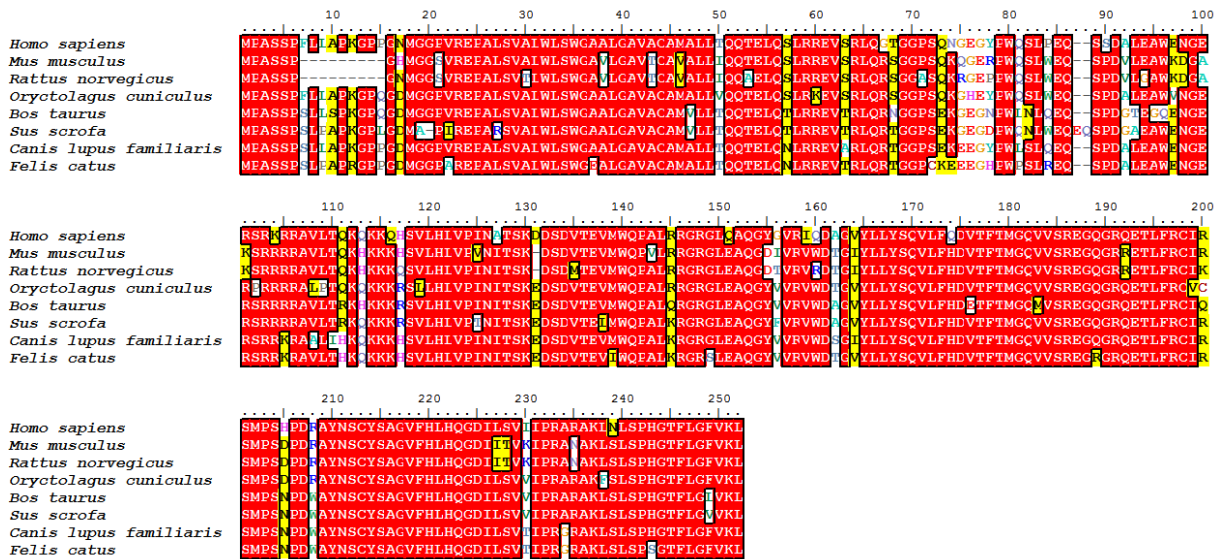
- a) Resultados da simulação computacional através da análise da modelagem por homologia das proteínas envolvidas;
- b) Cálculos de energia livre por dinâmica molecular pelo método de Energia de Interação Linear (LIE), após a mutagênese de TACI;
- c) Dinâmica molecular com os peptídeos mutados e com TACI em diferentes condições de clivagens das pontes dissulfeto;
- d) Análise filogenética das sequências de APRIL de diferentes espécies
- e) Dinâmica molecular dos peptídeos T0-T13 durante 30 ns de simulação.
- f) Resultados do ensaio imunoenzimático em placas sensibilizadas com TACI e BCMA.

4.1. Alinhamento sequencial

Para caracterizar as sequências de APRIL, e avaliar possíveis regiões variáveis que sirvam como indício da especificidade, foi feito um alinhamento das sequências expressas em *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, *Canis familiaris* e *Felis catus*.

A conservação sequencial de algumas regiões é indicativo de baixa seletividade e possível reação cruzada com os receptores. A partir do alinhamento das sequências de APRIL provenientes das espécies citadas, observamos a conservação interespecífica dessa proteína (figura 11).

A



B

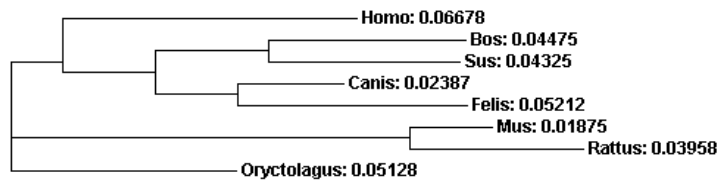


Figura 11 – Alinhamento interespecífico da sequência linear e filogenia de APRIL. A) Alinhamento entre as sequências de APRIL provenientes de diferentes espécies. São encontradas algumas substituições, embora as sequências sejam conservadas entre as espécies comparadas. B) Dendrograma da relação entre as sequências das cinco espécies comparadas. Os valores mostrados referem-se à distância em relação a um ancestral comum.

As substituições existentes em APRIL ocorrem principalmente em regiões não relacionadas ao reconhecimento do receptor TACI: 179-187 (TMGQVVSRE), 191-197 (RQETLFR), 204-210 (SHPDRAY), 230-232 (IIP) e 241-243 (SPH), correspondendo à numeração da sequência da proteína humana, depositada no banco de dados Uniprot (Leinonen, Diez et al., 2004) sob o código O75888.

A presença de tais substituições justificou a construção do modelo por homologia da proteína humana, em detrimento da utilização da estrutura cristalográfica murina. O alinhamento sequencial apontou uma alta conservação de APRIL entre diferentes

espécies. Com exceção do segmento RRETLFR, as variações se localizam em regiões de alça (*loop*), em sua maioria fora do sítio de reconhecimento caracterizado no cristal de APRIL ligado a TACI, depositado no PDB (tabela 2). A análise da estrutura secundária de APRIL murino mostrou que as regiões que sofrem variação encontram-se principalmente em segmentos de loop, com exceção da sequência RRETLFR (figura 12).

Tabela 2 – Substituições observadas entre APRIL humana e murina na região de reconhecimento.

Humano	191 RQETLFR 197	204 SHPDRAY 210	230 IIP 232
Murino	180 RRETLFR 186	193 SDPDRAY 199	219 KIP 221

As distâncias filogenéticas entre APRIL humana (0,066) e murina (0,018) apontam uma origem comum, indicando que a estrutura de APRIL murina pode ser usada como molde para a determinação da estrutura de APRIL humana (figura 11).

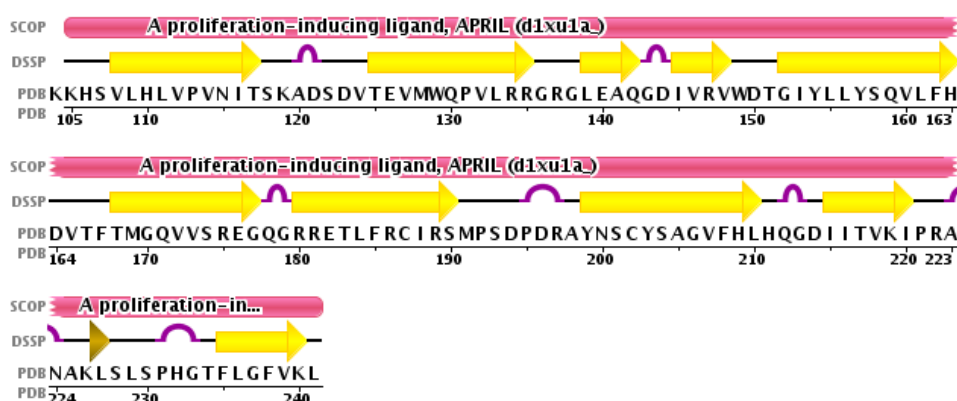
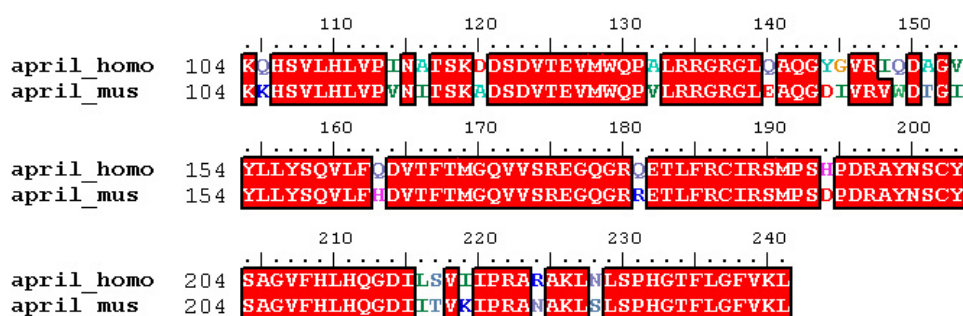


Figura 12 – Estrutura secundária de APRIL humana encontrada no monômero (1XU1), calculada pelo DSSP. Com exceção da sequência RRETLFR, as regiões que sofrem variação se encontram principalmente em segmentos de alça.

A sequência do domínio secretado de APRIL humana alinhada ao domínio correspondente, proveniente de camundongo, é mostrada na figura 13A, onde é

possível observar uma discordância de 20 aminoácidos entre as sequências. Para fim de comparação com a sequência de BAFF equivalente ao domínio solúvel de APRIL, foi feito o alinhamento entre as sequências de BAFF humana e murina. Cabe notar, novamente, a presença de 20 aminoácidos diferentes, porém em regiões não equivalentes às de APRIL (figura 13B).

A



B



Figura 13 - Alinhamento entre as sequências dos monômeros secretados de APRIL e BAFF isoladas de *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Em A, a sequência de APRIL murina, extraída do cristal 1XU1 e a sequência de APRIL humana, obtida no banco de dados Entrez Protein sob o código BAE16556. Em B, a sequência de BAFF humana, extraída do cristal 1KXG e a sequência de BAFF murina, obtida no banco de dados Entrez Protein, sob o código AAD22475.

A análise do alinhamento de APRIL mostra que o molde murino é adequado à construção do modelo humano dado que a identidade entre as sequências é de 85,4%, enquanto a similaridade é de 92%.

Embora algumas regras utilizando o alinhamento sequencial já tenham sido sugeridas para a identificação de *hot spots* em interfaces proteicas, quando aplicadas em interfaces maiores, essas regras se tornam pouco confiáveis.(Tuncbag, N., Gursoy, A. *et al.*, 2009) Os motivos prováveis seriam a alta complexidade estrutural, a variação da exposição ao solvente e a extrema diversidade de formas da interface. Essas observações levaram a conclusões conflitantes quando comparadas com a energia de interação identificada por *alanine scanning*.(Lo Conte, Chothia *et al.*, 1999)

A correta identificação dos *hot spots* não é óbvia quantificando-se somente os contatos visíveis na interface proteica. Em muitos casos, interações encontradas no centro da interface foram apontadas como mais importantes que as existentes na periferia, mas não há relação direta entre a acessibilidade ao solvente e a contribuição de um resíduo para a energia de ligação.(Clackson e Wells, 1995; Bogan e Thorn, 1998) Outra observação remete à presença de resíduos polares e carregados (Arg, Gln, His, Asp, Asn) conservados na interface e sua importância na formação de *hot spots*.(Hu, Ma *et al.*, 2000)

De qualquer forma, muitos *hot spots* envolvem resíduos hidrofóbicos ou aromáticos e ainda não é claro se interações polares enterradas na superfície são energeticamente estabilizadoras ou somente facilitadoras da especificidade.(Hendsch e Tidor, 1994) É relevante também o papel de resíduos que não apresentam contatos significativos na interface, mas contribuem significativamente para a energia de ligação quando testados por *alanine scanning*, provavelmente devido à desestabilização das proteínas quando separadas.(Delano, 2002)

4.2. Construção do modelo tridimensional do trímero da APRIL humana

A estrutura tridimensional do trímero da APRIL murina complexada com o ligante TACI_D2 está depositada no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank - PDB*), sob o código 1XU1.(Hymowitz, Patel *et al.*, 2005). O programa Procheck, utilizado para determinar as características estereoquímicas do homotrímero humano construído, apontou 93,8% dos resíduos em regiões favoráveis, 5,6% em regiões adicionalmente permitidas e 0,6 em regiões generosamente permitidas, indicando, portanto uma estrutura de alta qualidade (figura 14).

Embora existam somente 20 aminoácidos diferentes entre as estruturas murina e humana de APRIL, algumas dessas alterações se encontram em regiões de contato com os receptores, como descrito na tabela 2. O domínio extracelular típico dos receptores da família TNF contém regiões ricas em cisteínas. TACI é um membro dessa família, possuindo dois CRDs (TACI_D1 e TACI_D2). Nota-se que ambos os domínios são similares entre si (~50% de identidade), ao contrário de outros receptores da mesma família.(Hymowitz, Patel *et al.*, 2005) Ambos os CRDs contêm o motivo DXL e são capazes de interagir com APRIL. No entanto, o domínio TACI_D2 isoladamente é capaz de se ligar com alta afinidade à essa mesma proteína, sem que essa afinidade seja potencializada quando associados os dois domínios CRD.(Hymowitz, Patel *et al.*, 2005).

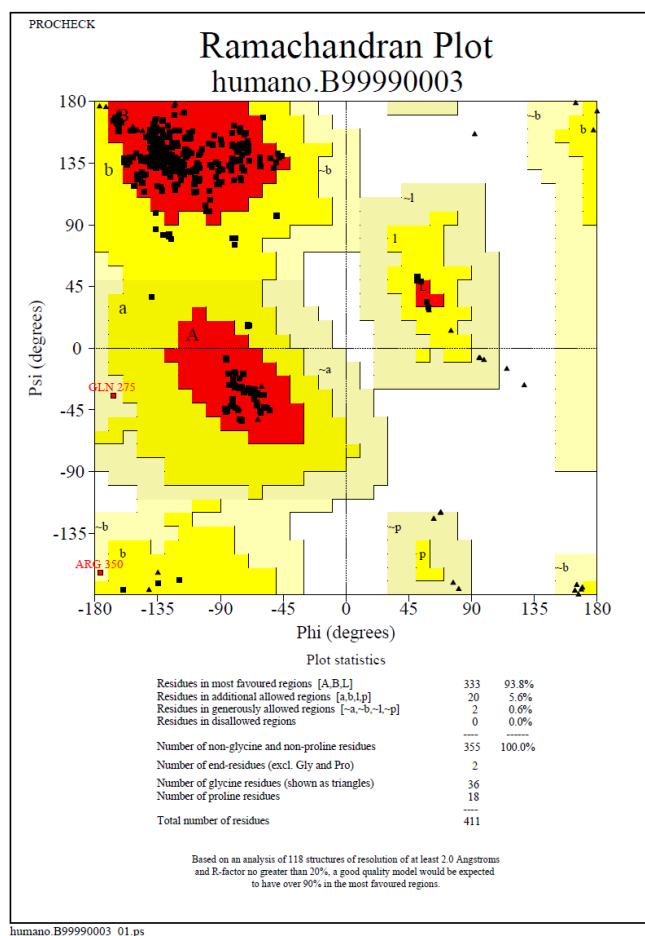


Figura 14 – Gráfico de Ramachandran do modelo do trímero da APRIL humana. A presença de 93,8% dos resíduos em regiões estericamente permitidas, 5,6% em regiões adicionalmente permitidas e 0,6% em regiões generosamente permitidas indica que o modelo é estereoquimicamente adequado.

O detalhamento da rede de contatos entre o motivo DXL e APRIL é mostrado na figura 15A. É possível encontrar um motivo semelhante em BCMA (DSL), com uma rede de contatos formada na região equivalente em APRIL (figura 15B). Na figura 15C, são detalhadas as ligações hidrogênio encontradas entre DXL e APRIL. Nota-se a interação simultânea entre TACI D80 com F63 e R118 de APRIL. H81 não forma interações com APRIL, enquanto L82 forma duas ligações com APRIL R82. Apesar da identidade sequencial de 30%, a similaridade estrutural é grande (1.1Å de Desvio Quadrático Médio (RMSD) para os C α dos aminoácidos alinhados). As

estruturas secundárias são conservadas em regiões equivalentes, com exceção do loop DE, com maior extensão em BAFF, constituindo uma espécie de *flap*.



Figura 15 – Detalhe das ligações de Hidrogênio formadas entre a tríade DHL de TACI e APRIL. Nota-se a interação simultânea entre TACI D80 com F63 e R118 de APRIL. H81 não forma interações com APRIL, enquanto L82 forma duas pontes com APRIL R82.

A estrutura cristalográfica de APRIL mostra que a região que comporta o motivo DXL, localizada na extremidade de um domínio do tipo grampo beta, se liga em uma cavidade de potencial eletrostático predominantemente positivo, como mostrado pelo perfil eletrostático na figura 16.

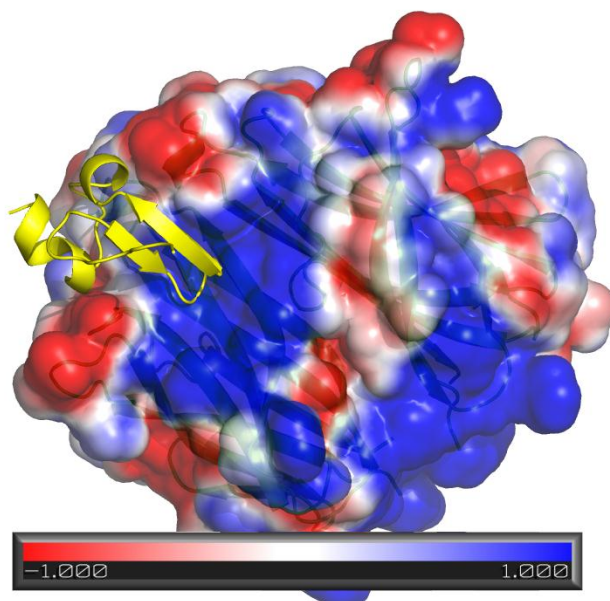


Figura 16 – Perfil eletrostático de APRIL dimérico complexado com TACI. APRIL está representado pela superfície eletrostática e TACI em estrutura secundária amarela. A região de reconhecimento *beta hairpin* se posiciona em uma região predominantemente positiva, representada em azul. As regiões representadas em vermelho são regiões predominantemente negativas. O perfil eletrostático foi calculado com o programa APBS.

4.3. Estrutura mínima de TACI necessária para interação do APRIL

Para determinar qual seria o menor fragmento de TACI capaz de interagir com APRIL sem perder a estrutura secundária da tríade de reconhecimento DXL, foi feita uma série de simulações em solvente explícito, tendo como alvo TACI_D2, mutando sistematicamente por glicina as cisteínas que participam da formação das pontes dissulfeto presentes nesse domínio (figura 17). Essa série foi planejada de maneira a estabelecer diferentes combinações das três pontes dissulfeto presentes em

TACI_D2, após impedimento de sua formação. O objetivo desse ensaio foi verificar a possibilidade de uma redução na sequência de T0, facilitando a manipulação durante a clonagem dos peptídeos para testes biológicos subsequentes.

A primeira combinação foi a estrutura de TACI nativa, como presente no cristal 1XU1 (controle positivo). Na segunda combinação eliminamos as três pontes dissulfeto (controle negativo) e nas cinco conformações seguintes, as pontes foram clivadas em diferentes pontos.



Figura 17 – Sequencia de TACI_D2. São destacadas as cisteínas (em amarelo) e as pontes dissulfeto formadas nesse domínio (linhas pretas interligando as cisteínas).

A análise da estrutura secundária durante a evolução temporal indicou que as ligações formadas entre Cys71-Cys86 e Cys89-Cys100 foram capazes de manter as duas folhas beta que flanqueiam a tríade DXL, conservando a estrutura dessa região, indispensável para o reconhecimento dos receptores (figura 18). A terceira ponte, formada entre Cys93-Cys104, situada na extremidade N-terminal, poderia ser eliminada e ainda assim a estrutura global originária seria mantida.

A eliminação de C86 claramente apresenta um efeito deletério na estrutura secundária de TACI, amparado pela redução do comprimento das folhas beta na região compreendida entre os resíduos C71-C86.

Em todos os gráficos (exceto na figura 18E) nota-se claramente a mudança da alça entre K77 e R84 para uma estrutura com uma curvatura acima de 70° (*Bend*), o que poderia levar a impossibilidade no reconhecimento por parte de APRIL.

Na figura 18E é possível notar a manutenção da alça nessa região. Essa figura corresponde à eliminação da ponte C93-C104, fora da região correspondente ao motivo de reconhecimento DXL. Esse resultado é encorajador, sugerindo a possibilidade da redução do número de aminoácidos envolvidos nesse domínio, facilitando a clonagem e a manipulação dos peptídeos mutados.

Pela natureza intrincada desse domínio, devido à complexidade das ligações dissulfeto, outros ensaios seriam necessários para afirmar que a estrutura mínima de TACI capaz de reconhecer e se ligar com estabilidade em APRIL está relacionada à manutenção das pontes formadas entre Cys71-Cys86 e Cys93-Cys100. Ainda assim, a partir das simulações realizadas, podemos afirmar que essas duas pontes são cruciais para a manutenção do sítio de ligação de TACI.

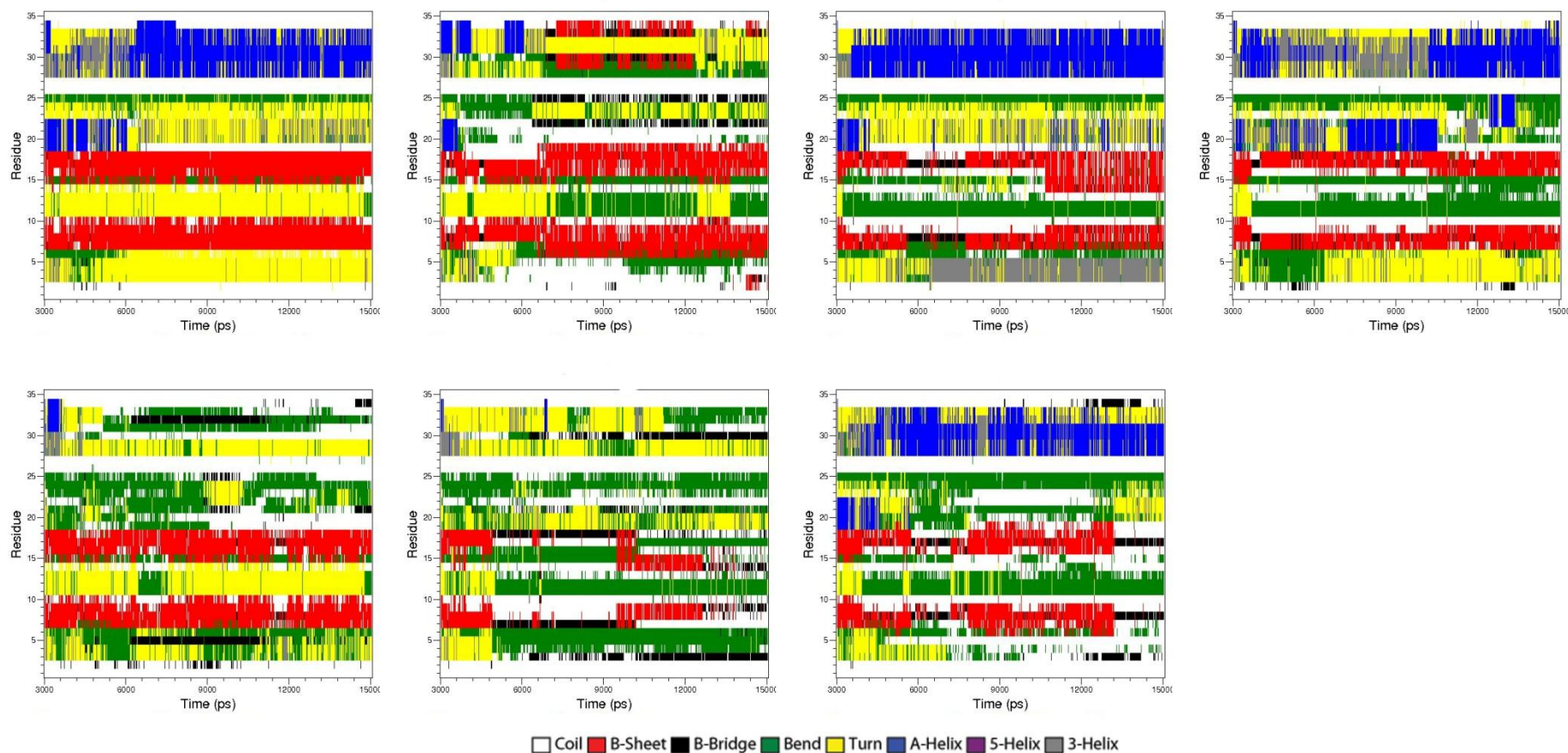


Figura 18 - Estrutura secundária de TACI em diferentes condições de clivagem das pontes dissulfeto. A: Manutenção das três ligações dissulfeto; B: eliminação das três ligações; C: eliminação da ponte C71-C86; D: eliminação da ponte C89-C100; E: eliminação da ponte C93-C104; F: eliminação das pontes C71-C86 e C93-C104; G: eliminação das ligações C71-C86 e C89-C100.

4.4. Cálculo de energia livre de ligação de TACI no reconhecimento de APRIL e BAFF

A análise dos valores de energia livre de ligação revelou uma série de resíduos importantes em TACI para o reconhecimento de APRIL e BAFF. Os valores de $\Delta\Delta G$ positivos apontam resíduos, na estrutura de TACI, cuja mutação por alanina é prejudicial ao reconhecimento do ligante, tornando o aminoácido mutado um resíduo chave para a ligação, enquanto valores negativos indicam uma mutação favorável. O $\Delta\Delta G$ foi calculado aplicando-se a seguinte equação:

$$\Delta\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta G_{\text{mutado}} - \Delta G_{\text{selvagem}}$$

Nesse trabalho, os resíduos são considerados *hot spots* quando $\Delta\Delta G > +2$ kcal/mol. De acordo com (Kortemme e Baker, 2002), são definidos como pontos “mornos” os resíduos que causam uma mudança positiva na energia livre entre 2 e 1 kcal/mol, e pontos neutros os que causam uma mudança de menos de 1 kcal/mol. Valores de $\Delta\Delta G$ negativos sugerem resíduos desfavoráveis para a interação entre o ligante e o receptor. Os valores de $\Delta\Delta G$, ΔG , potencial eletrostático e potencial de Lennard-Jones obtidos mediante a aplicação da técnica LIE para as mutações por Ala são mostrados na tabela 3, para APRIL e tabela 4, para BAFF.

Tabela 3 – Valores de energia potencial eletrostática, Lennard-Jones e energia livre de ligação calculados para todos os resíduos de TACI_D2 em complexo com APRIL.

Resíduo	ΔG WT	ΔG mutado	ΔU^{el} WT	ΔU^{el} Mut	ΔU^{vdw} WT	ΔU^{vdw} MUT	$\Delta \Delta G$
R72	7,84 ±1,55	0,34 ±0,93	-45,90 ±2,70	-31,29 ±1,15	-22,12 ±1,06	-12,67 ±0,46	-7,51 ±1,81
K73	3,83 ±0,88	-0,41 ±0,75	-33,09 ±1,59	-32,69 ±0,87	-20,69 ±1,61	-13,14 ±0,62	-4,24 ±1,15
E74	4,36 ±0,53	-0,20 ±0,94	-31,97 ±0,92	-33,17 ±0,95	-24,32 ±0,97	-11,10 ±0,41	-4,55 ±1,08
Q75	0,08 ±1,04	0,29 ±1,25	-47,85 ±2,01	-32,97 ±2,33	-17,20 ±2,09	-10,39 ±1,03	0,22 ±1,63
G76	0,58 ±0,67	0,25 ±0,68	-31,08 ±1,27	-32,28 ±1,09	-11,58 ±0,44	-13,51 ±1,41	-0,33 ±0,96
K77	5,97 ±1,08	0,65 ±0,74	-30,64 ±2,22	-29,58 ±0,85	-25,83 ±0,95	-14,86 ±0,27	-5,31 ±1,31
F78	-0,01 ±0,36	-0,42 ±0,61	-32,62 ±0,42	-30,98 ±1,29	-29,02 ±0,36	-14,85 ±0,56	-0,42 ±0,71
Y79	0,47 ±0,76	-0,16 ±0,73	-48,75 ±1,57	-32,88 ±1,06	-22,41 ±1,41	-13,00 ±0,38	-0,63 ±1,06
D80	0,60 ±1,15	0,07 ±0,87	-55,26 ±2,93	-29,96 ±1,84	-18,05 ±0,76	-14,61 ±0,43	-0,53 ±1,44
H81	1,35 ±1,28	-0,34 ±0,39	-49,03 ±2,55	-34,24 ±0,59	-17,17 ±0,86	-11,25 ±0,86	-1,70 ±1,34
L82	-0,55 ±0,66	0,36 ±0,38	-33,66 ±1,44	-33,18 ±0,70	-22,07 ±0,38	-11,66 ±0,46	0,91 ±0,76
L83	1,81 ±0,29	-0,66 ±1,08	-28,08 ±0,46	-30,80 ±2,28	-24,51 ±0,78	-13,33 ±1,65	-2,47 ±1,11
R84	6,30 ±0,77	-0,09 ±0,40	-46,73 ±1,49	-32,85 ±0,61	-22,61 ±0,86	-10,57 ±0,21	-6,38 ±0,86
D85	4,33 ±0,90	-0,37 ±0,43	-41,50 ±2,16	-29,70 ±0,60	-17,18 ±0,79	-13,40 ±0,50	-4,70 ±1,00
I87	0,71 ±0,30	0,24 ±0,31	-30,66 ±0,57	-31,54 ±0,51	-23,57 ±0,46	-14,77 ±0,43	-0,48 ±0,43
S88	0,66 ±0,87	-0,07 ±0,55	-47,51 ±2,04	-32,69 ±0,66	-13,19 ±0,63	-13,42 ±0,29	-0,74 ±1,03
S91	0,97 ±0,98	-0,53 ±0,41	-44,48 ±1,86	-33,08 ±0,84	-9,92 ±0,47	-11,23 ±0,44	-1,50 ±1,07
I92	0,64 ±0,68	0,19 ±0,80	-29,22 ±1,15	-30,64 ±1,62	-22,52 ±0,64	-13,51 ±0,79	-0,45 ±1,05
G94	0,36 ±0,50	-0,06 ±0,22	-32,91 ±0,76	-33,69 ±0,32	-8,14 ±0,46	-9,16 ±0,22	-0,42 ±0,55
Q95	1,43 ±0,99	0,39 ±0,44	-44,84 ±1,88	-31,00 ±0,72	-19,42 ±1,13	-12,39 ±0,57	-1,04 ±1,09
H96	-0,61 ±1,39	0,31 ±0,53	-35,42 ±2,19	-18,59 ±0,87	-22,68 ±0,62	-10,85 ±0,57	0,92 ±1,49
P97	0,98 ±0,55	1,11 ±0,73	-16,96 ±1,03	-31,23 ±1,17	-18,75 ±0,75	-12,34 ±1,27	0,14 ±0,91
K98	4,73 ±0,54	0,26 ±0,45	-35,84 ±0,91	-34,17 ±0,93	-18,31 ±1,27	-10,26 ±0,46	-4,47 ±0,71
Q99	-2,01 ±1,71	-0,03 ±0,54	-48,50 ±0,94	-33,36 ±1,03	-19,94 ±0,73	-11,74 ±0,55	1,97 ±1,79
Y102	0,52 ±0,51	-0,03 ±0,32	-49,83 ±0,89	-32,65 ±0,31	-19,45 ±1,00	-10,86 ±0,64	-0,55 ±0,60
F103	0,57 ±0,89	-0,19 ±0,63	-34,06 ±1,18	-33,20 ±1,28	-23,42 ±0,58	-11,59 ±1,13	-0,77 ±1,09

* ΔG : Energia livre de ligação, **WT**: selvagem, **Mut**: Mutado por alanina, ΔU^{el} : Potencial eletrostático, ΔU^{vdw} : Potencial de Lennard-Jones, $\Delta \Delta G$: Variação da energia livre de ligação. Os resíduos com um (*) foram corrigidos de acordo com a fórmula $1.35|pH-Pka|$.

Tabela 4 - Valores de energia potencial eletrostática, Lennard-Jones e energia livre de ligação calculados para todos os resíduos de TACI_D2 em complexo com BAFF.

Resíduo	ΔG WT	ΔG mutado	ΔU^{el} WT	ΔU^{el} Mut	ΔU^{vdw} WT	ΔU^{vdw} MUT	$\Delta \Delta G$
R72	-0,55 ±3,17	-1,93 ±0,87	-49,98 ±2,12	-32,88 ±1,55	-21,33 ±0,82	-12,77 ±0,61	-6,12 ±1,52
K73	0,91 ±1,20	0,01 ±0,87	-31,57 ±2,40	-32,10 ±1,07	-22,79 ±0,61	-13,99 ±0,55	-5,76 ±1,37
E74	-1,65 ±2,41	-0,16 ±0,63	-35,80 ±1,50	-33,12 ±1,06	-22,72 ±0,96	-10,55 ±0,71	-2,57 ±1,28
Q75	0,48 ±1,35	-0,06 ±0,78	-46,63 ±2,49	-31,62 ±1,14	-15,93 ±1,00	-10,20 ±0,55	-0,55 ±1,56
G76	0,08 ±0,36	0,06 ±0,56	-33,74 ±0,57	-33,44 ±0,77	-9,01 ±0,44	-11,86 ±0,56	-0,02 ±0,67
K77	1,61 ±1,33	-0,15 ±0,88	-33,83 ±1,48	-30,11 ±1,39	-21,73 ±0,60	-14,31 ±0,79	-4,67 ±1,10
F78	0,32 ±0,49	0,30 ±0,40	-32,62 ±0,68	-31,08 ±0,70	-29,58 ±0,99	-14,68 ±0,44	-0,02 ±0,63
Y79	-0,17 ±0,80	0,03 ±0,67	-47,60 ±0,92	-31,95 ±1,00	-25,81 ±1,09	-13,39 ±0,65	0,23 ±0,97
D80	-0,61 ±1,53	1,52 ±0,59	-50,82 ±2,50	-28,68 ±1,02	-18,39 ±0,98	-15,60 ±0,44	-2,03 ±1,21
H81	-0,25 ±1,17	-0,10 ±0,56	-53,24 ±1,73	-33,94 ±1,14	-20,70 ±0,98	-10,78 ±0,65	0,15 ±1,30
L82	-1,45 ±0,61	-0,70 ±0,57	-37,14 ±1,19	-35,60 ±1,21	-20,32 ±0,64	-11,21 ±0,43	0,75 ±0,83
L83	-0,63 ±0,34	-0,08 ±0,25	-36,15 ±0,53	-35,97 ±0,41	-17,03 ±0,42	-9,17 ±0,50	0,54 ±0,42
R84	-2,66 ±1,84	0,00 ±0,37	-47,80 ±1,64	-33,46 ±0,31	-21,45 ±0,78	-10,52 ±0,58	-4,07 ±0,56
D85	0,06 ±3,37	-0,06 ±0,35	-43,21 ±0,75	-29,14 ±0,18	-16,31 ±0,48	-12,98 ±0,19	-3,96 ±0,49
I87	-0,38 ±0,58	-0,09 ±0,46	-32,37 ±0,58	-32,35 ±0,97	-23,02 ±0,48	-13,62 ±0,42	0,29 ±0,74
S88	0,21 ±0,82	-0,22 ±0,65	-48,02 ±1,42	-32,78 ±0,93	-11,84 ±0,95	-12,93 ±0,29	-0,51 ±1,12
S91	0,23 ±1,44	0,11 ±0,28	-43,21 ±3,29	-32,35 ±0,54	-10,28 ±0,99	-10,40 ±0,42	-0,10 ±1,47
I92	-0,30 ±0,61	-0,58 ±0,77	-30,39 ±0,88	-31,18 ±0,91	-22,55 ±0,49	-10,86 ±0,95	-0,27 ±0,99
G94	-0,23 ±0,45	0,43 ±0,50	-33,77 ±0,61	-32,30 ±0,91	-8,11 ±0,24	-10,24 ±0,78	0,67 ±0,67
Q95	0,15 ±0,69	0,99 ±0,61	-46,68 ±0,89	-29,16 ±0,36	-17,85 ±1,19	-13,45 ±0,45	0,84 ±0,92
H96	1,39 ±1,11	0,30 ±0,53	-31,45 ±1,39	-18,19 ±0,86	-24,69 ±1,53	-11,11 ±0,37	-1,09 ±1,23
P97	-0,19 ±0,46	0,72 ±1,10	-19,31 ±0,86	-30,07 ±2,25	-18,28 ±1,19	-14,17 ±0,62	0,91 ±1,19
K98	3,86 ±1,52	0,92 ±0,81	-33,62 ±1,92	-32,38 ±1,42	-20,47 ±1,04	-10,68 ±1,17	-4,42 ±1,18
Q99	1,34 ±1,21	0,22 ±0,70	-42,50 ±1,78	-34,04 ±1,10	-20,89 ±1,49	-11,10 ±0,47	-1,12 ±1,40
Y102	0,38 ±0,60	0,04 ±0,30	-52,08 ±1,19	-32,71 ±0,49	-14,84 ±0,61	-10,82 ±0,33	-0,36 ±0,69
F103	-0,62 ±1,34	0,04 ±0,75	-33,78 ±1,22	-33,51 ±1,02	-20,57 ±1,82	-10,12 ±0,93	0,65 ±1,53

* ΔG : Energia livre de ligação, **WT**: selvagem, **Mut**: Mutado por alanina, ΔU^{el} : Potencial eletrostático, ΔU^{vdw} : Potencial de Lennard-Jones, $\Delta \Delta G$: Variação da energia livre de ligação. Os resíduos com um (*) foram corrigidos de acordo com a fórmula $1.35|pH-Pka|$.

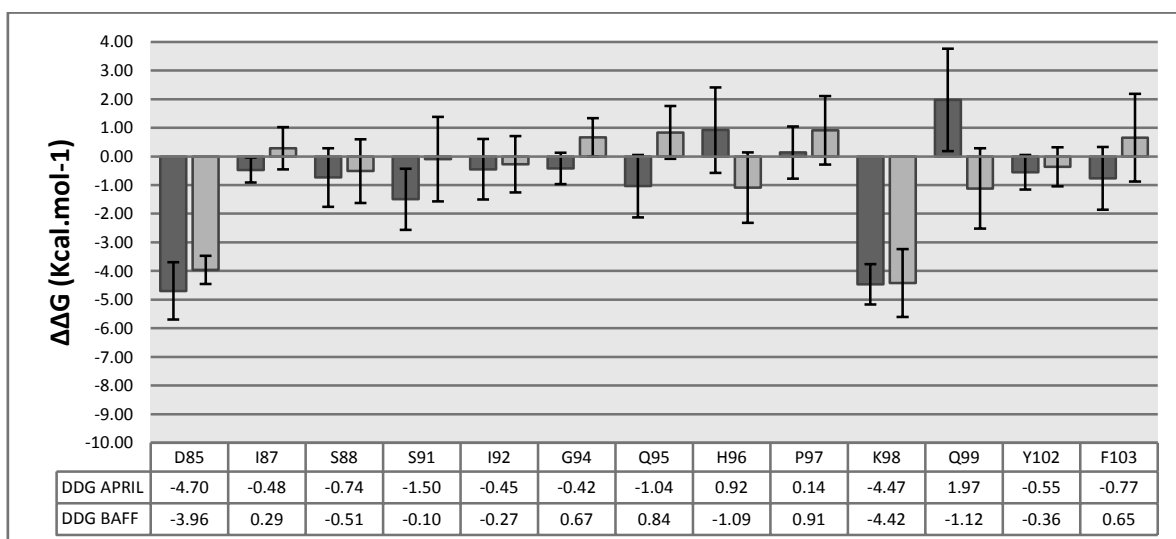
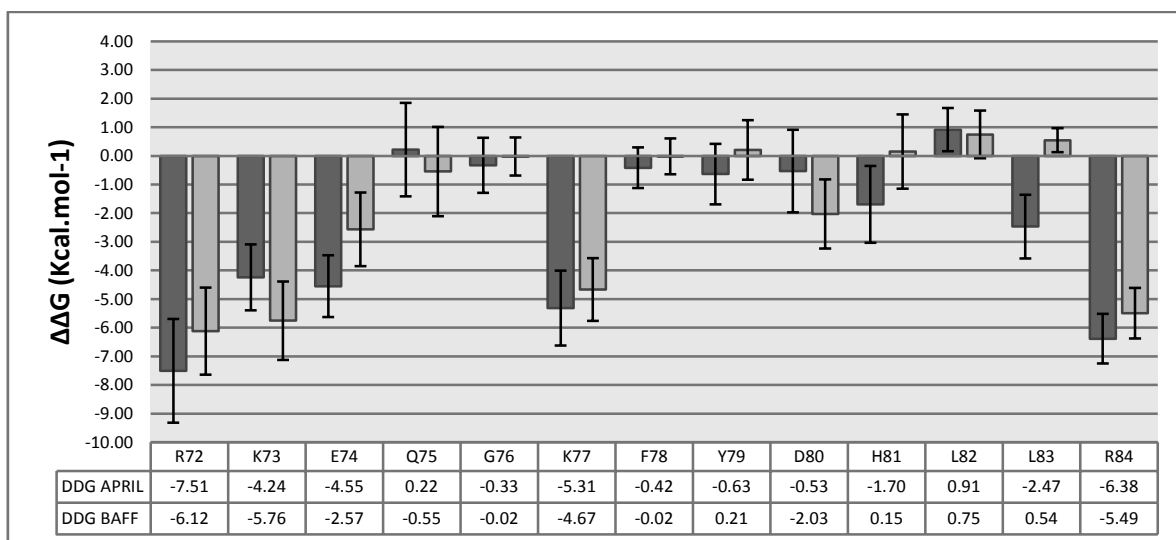


Figura 19 – Análise da variação de energia livre utilizando LIE, após mutação por alanina. Para fins práticos, não realizamos a mutação em cisteínas e alaninas. É possível detectar os resíduos componentes de *hot spots* a partir da variação de energia livre, para APRIL ou BAFF. Para ser considerado um *hot spot*, a energia livre do resíduo mutado por alanina deve ter uma variação positiva. Resíduos com essa variação para APRIL e com variação negativa para BAFF, são considerados resíduos específicos para a interação com APRIL.

O perfil dos *hot spots* avaliado por LIE se mostrou bastante distinto dos demais métodos. De acordo com a classificação adotada (resíduos com $\Delta\Delta G \geq 0$ kcal/mol após mutação por alanina) e a metodologia empregada, os resíduos importantes para o reconhecimento APRIL/TACI são Gln75, Leu82, His96, Pro97 e Gln99, enquanto os resíduos Tyr79, His81, Leu82, Leu83, Ile87, Gly94, Gln95, Pro97 e

Phe103 são essenciais para a interação BAFF/TACI (figura 19). É importante notar que os resíduos com valores discrepantes de $\Delta\Delta G$ para APRIL e BAFF são melhores alvos para a mutação dirigida. A variação positiva do $\Delta\Delta G$ de um resíduo de TACI, quando mutado por alanina, indica que a troca por outro aminoácido, que não o nativo, pode contribuir para o aumento na afinidade da interação, na interface entre o APRIL e esse receptor. Simultaneamente, os resíduos que apresentam $\Delta\Delta G$ negativo para BAFF, se apresentam ideais para o desenho de peptídeos específicos para APRIL.

Embora, de acordo com o servidor PISA (Krissinel e Henrick, 2007), a região de contato entre APRIL e TACI seja formada pelos resíduos Lys73, Phe78, Asp80, His81, Leu82, Leu83, Arg84, Ile87, Ser91, Ile92, Gly94, Gln95, His96, Pro97, Lys98 e Gln99, em TACI, somente os resíduos Leu82, His96, Pro97 e Gln99, exercem contribuição energética relevante, a ponto de influenciar negativamente a interação com o ligante quando mutados por alanina (figura 20). Esses quatro resíduos compõem então uma região quente (*hot region*). (Tuncbag, N., Gursoy, A. *et al.*, 2009)

A diferença obtida na detecção dos *hot spots* por LIE, em relação aos outros métodos, pode ser devida a utilização de coeficientes inadequados para esse sistema, ou por falha do método. É possível ainda que simulações mais longas, visando à estabilidade do sistema e uma maior amostragem sejam necessárias, permitindo a medição mais precisa dos valores de energia livre.

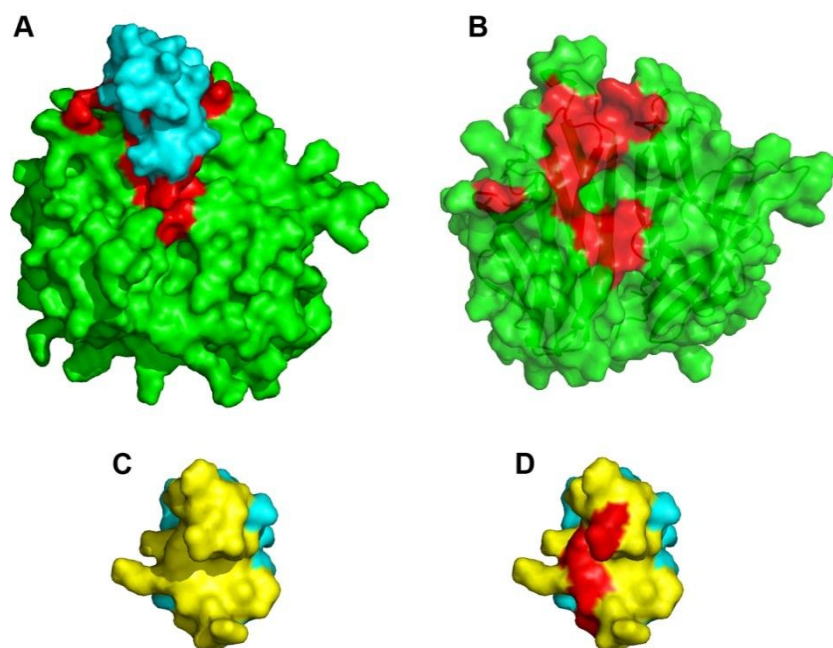


Figura 20 – Superfície de contato entre APRIL e TACI e hot spot calculado por LIE. A: complexo APRIL-TACI. Em verde a superfície de APRIL, em ciano, a superfície de TACI e em vermelho a interface de contato entre ambas. B: superfície de contato de APRIL. Os resíduos marcados em vermelho mantém contato direto com TACI. Essa região é composta pelos resíduos D130, V174, T175, F176, T177, V181, T192, R195, M200, P201, P230, R231 de um dos monômeros e D205, R206 e H241 no segundo monômero. C: superfície de contato de TACI. A região ressaltada em amarelo se encontra em contato direto com APRIL. Os resíduos que compõem essa região são K73, F78, D80, H81, L82, L83, R84, I87, S91, I92, G94, Q95, H96, P97, K98 e Q99. D: superfície de TACI mostrando os resíduos responsáveis pelo *hot spot* desse receptor em vermelho. Os aminoácidos Q75, L82, H96, P97 e Q99 formam a região quente (*hot region*) de TACI.

Comparando com o perfil eletrostático mostrado na figura 16, verificamos que esses *hot spots* interagem com uma região de potencial eletrostático predominantemente positivo em APRIL.

4.5. Comparação do método LIE com alanine scanning experimental e outros métodos computacionais

Para fins de verificação dos nossos cálculos de energia livre, realizamos a comparação com o *shotgun alanine scanning* realizado por Hymowitz *et al*, 2005, utilizando o complexo APRIL/TACI_{D2} murino e submetemos os mesmos complexos avaliados em nosso trabalho para o servidores Robetta (Kim, Chivian *et al.*, 2004),

FoldX (Schymkowitz, Borg et al., 2005) e Hotpoint (Tuncbag, Keskin *et al.*, 2010) (figura 21). A análise dos dados apresentados pelo trabalho de Hymowitz *et al* envolve a avaliação da frequência de aparecimento dos resíduos nativos ou da expressão do códon que codifica a alanina após cada rodada de *shotgun*.

A frequência de aparecimento do resíduo nativo ou da alanina determina a importância relativa do resíduo. Uma maior frequência de aparecimento do resíduo nativo indica que esse aminoácido é importante para a interação, enquanto uma maior frequência de aparecimento de alanina aponta uma menor relevância. São necessárias então, várias repetições para atingir um número confiável.

A varredura por alanina experimental revelou resíduos determinantes únicos para TACI. Parte dos dados obtidos através de nossos cálculos reproduziu os resultados obtidos desse estudo, embora a proteína murina tenha sido usada para o *shotgun*. Nossas simulações foram conduzidas utilizando APRIL, BAFF e TACI humanos.

Os resíduos Phe78, Tyr79, Asp80, Leu82, Leu83, Ile87, Ile92, Gly94, His96 e Pro97 foram observados em sua forma nativa com maior frequência que os resíduos de alanina (figura 22). Já os resíduos Asp80, Leu82, Ile87 e Pro97 não foram substituídos por alanina em nenhum momento, sugerindo que esses resíduos têm uma importância maior em TACI que os demais, para interação com APRIL. Dados do mesmo experimento mostraram que, dentre esses quatro resíduos apontados, Asp80, Leu82 e Ile87 são também *hot spots* para BAFF. É notável a observação de que o resíduo Leu83, mesmo sendo intolerante à mutação por alanina, sofreu substituições por valina nessa posição, embora com menor frequência. Comportamento similar foi notado para Ile87, onde somente foram detectadas

mutações por valina ou pelo próprio resíduo selvagem, indicando a importância de um aminoácido hidrofóbico nessa posição.

(LIE) APRIL	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(LIE) BAFF	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(Shotgun) APRIL	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(Shotgun) BAFF	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(FoldX) APRIL	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(FoldX) BAFF	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(Robetta) APRIL	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(Robetta) BAFF	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(HotPOINT) APRIL	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109
(HotPOINT) BAFF	71-CRKEQGKFDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR-109

Figura 21 – Comparação dos *hot spots* encontrados por diferentes métodos computacionais e *shotgun alanine scanning experimental*. Os resíduos marcados em vermelho compõem *hot spots* para APRIL; em azul, *hot spots* para BAFF. Os resíduos marcados em amarelo no *FoldX* representam resíduos desestabilizadores ($\Delta\Delta G \leq 2$ kcal/mol), enquanto os marcados em vermelho (APRIL) ressaltam os altamente desestabilizadores ($\Delta\Delta G \geq 2$ kcal/mol). No método *FoldX*, não foram encontrados *hot spots* para BAFF. O servidor *Robetta* foi capaz de detectar parcialmente os *hot spots* de APRIL, embora não tenha apresentado os *hot spots* para BAFF, como detectados pelo *shotgun scanning*.

O campo de força utilizado pelo FoldX atribui empiricamente um peso para cada termo energético: contribuição de van der Waals, energia livre das moléculas do solvente que formam mais do que uma ponte de hidrogênio com a proteína, energia de solvatação, contribuição eletrostática dos grupos carregados, dentre outros.

Os resíduos marcados em amarelo no FoldX representam resíduos desestabilizadores ($\Delta\Delta G \leq 2$ kcal/mol), enquanto os marcados em vermelho (APRIL) ressaltam os altamente desestabilizadores ($\Delta\Delta G \geq 2$ kcal/mol). De acordo com esse método, não foram encontrados *hot spots* para BAFF, enquanto, para APRIL, os

resíduos Asp80 e Leu82 foram considerados *hot spots* (altamente desestabilizadores, caso mutados por alanina).

O método utilizado pelo servidor Robetta oferece a estimativa da energia livre de ligação de cada resíduo na interface de contato, após substituição por alanina. O campo de força do Robetta utiliza praticamente os mesmos termos energéticos adotados pelo FoldX, exceto pelo fato das análises ocorrerem em solvente implícito. O resultado produzido fornece uma lista de resíduos capazes de desestabilizar a interação entre duas proteínas, porém somente são considerados os resíduos que tem contato direto, na interface. Nessa metodologia, a mobilidade dos resíduos é ignorada.

Os hot spots detectados pelo Robetta, para APRIL, foram parcialmente semelhantes ao *shotgun alanine scanning*. Asp80, Leu82, Leu83, Arg84 e Gln95, segundo esse método, são capazes de desestabilizar a interação com TACI. Dentre esses resíduos, Asp80, Leu82 e Leu83 também foram detectados pelo *shotgun*. No entanto, o método falhou na detecção dos hot spots para BAFF, localizando somente Leu82 e Gln95.

O método adotado pelo servidor *Hotpoint* (Tuncbag, Keskin et al., 2010) considera as seguintes características para classificar um resíduo como *hot spot*: acessibilidade ao solvente, conservação da sequência, empacotamento e caráter físico químico do resíduo (aromaticidade da cadeia lateral, por exemplo). Esse método aplica um algoritmo de aprendizado de máquina (*virtual learning machine*), calibrado por um conjunto de treinamento selecionado no AseDB (*alanine scanning experimental database*). (Thorn e Bogan, 2001) Esse método não se mostrou eficaz,

tanto para APRIL quanto para BAFF, mostrando como importantes somente dois resíduos em cada complexo.

Análises similares já foram reportadas tendo como objeto de estudo a ligação de BR3 e/ou BCMA com APRIL ou BAFF. (Gordon, Pan *et al.*, 2003; Patel, Wallweber *et al.*, 2004)

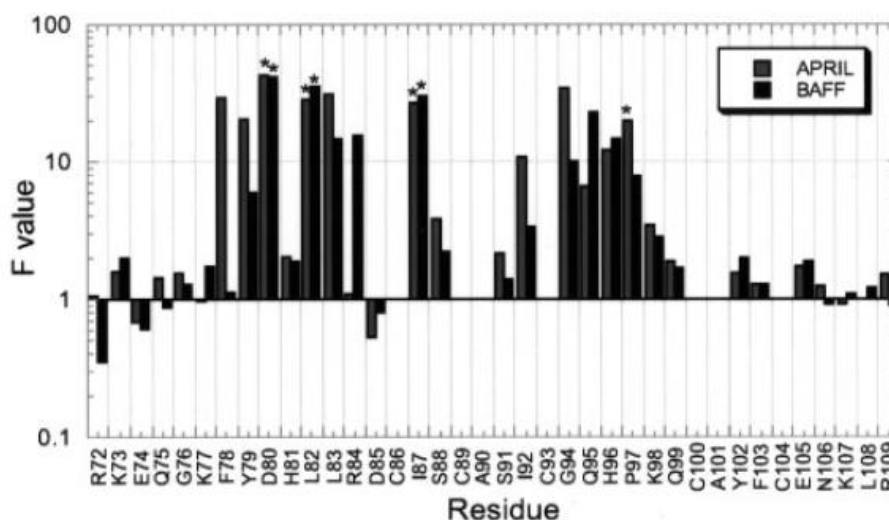


Figura 22 – Shotgun alanine scanning realizado com a estrutura de TACI_D2 ligada com APRIL ou BAFF. Os resíduos com uma frequência de aparecimento maior que 10 são considerados essenciais para o reconhecimento com os respectivos ligantes. Na posição equivalente aos resíduos marcados com (*) não foi detectada a presença de Ala. (Hymowitz, Patel *et al.*, 2005)

4.6. *Elaboração de peptídeos mutados*

As sequências dos peptídeos com potencial capacidade antagonista de APRIL foram planejadas a partir da análise dos comportamentos estrutural e/ou energético com base nas trajetórias da dinâmica molecular. As mutações na estrutura nativa de TACI (T0) foram realizadas tendo como objetivo o aumento no número de ligações de hidrogênio com a cadeia lateral ou com o esqueleto peptídico, entre APRIL e T0. Também foi levada em consideração a substituição por aminoácidos de cadeia lateral maior, plausíveis de conduzir à formação de novos

contatos, o aumento da hidrofobicidade em relação ao resíduo nativo, a mudança na polaridade e o favorecimento da formação de pontes salinas.

A relação das mutações propostas se encontra na tabela 5. A sequência correspondente à estrutura de T0 será utilizada como controle positivo para as simulações e para os ensaios biológicos.

Tabela 5 – Relação das mutações sugeridas em TACI, em função das análises energética e estrutural.

	80	90	100
		
T0 - 71	CRKEQ	GKFYD	HLLRDCIS
T1 - 71	CRKE LL KFYD	E LL E D	G IS C A N ICGQHP R Q C AYFC 104
T2 - 71	CRKEQ	I KFYD	HLLR D GIS C A S ICGQHP K Q C AYFC 104
T3 - 71	CRKEQ	F KFYD	HLL D D G IS C A Q ICGQHP H Q C AYFC 104
T4 - 71	CRKEQ	F KFYD	HLL D D G IS C A Q T C GQHP H Q C AYFC 104
T5 - 71	CRKEQ	F KFYD	E LL D D G IS C A Q ICGQHP H Q C AYFC 104
T6 - 71	CRKE L F	KFYD	H L E D D G IS C A Q T C GQHP H Q C AYFC 104
T7 - 71	CRKE L F	KFYD	H L E D D G IS C A Q S C Y Q H Q H Q CAYFC 104
T8 - 71	CRKE LL	KFYD	H L L E DCIS C A N ICGQHP R Q C AYFC 104
T9 - 71	CRKEQ	F KFYD	HLL D DCIS C A Q ICGQHP H Q C AYFC 104
T10 - 71	CRKEQ	F KFYD	HLL D DCIS C A Q T C GQHP H Q C AYFC 104
T11 - 71	CRKEQ	F KFYD	E LL D DCIS C A Q ICGQHP H Q C AYFC 104
T12 - 71	CRKE L F	KFYD	H L E D DCIS C A Q T C GQHP H Q C AYFC 104
T13 - 71	CRKE L F	KFYD	H L E D DCIS C A Q S C Y Q H Q H Q CAYFC 104

* Os resíduos destacados em vermelho sofreram alteração em relação à estrutura nativa de TACI (T0).

No total foram construídos 13 peptídeos mutados. As mutações R84E e R84D foram sugeridas devido a sua cadeia lateral nativa ser carregada positivamente, já que a mutação por um resíduo com carga negativa favoreceria a formação de uma ponte salina com o resíduo R195 de APRIL. As escolhas para tais substituições recaíram sobre Asp e Glu, com carga oposta a Arg.

As mutações S91N e S91Q foram introduzidas em todos os peptídeos, considerando o efeito da extensão dos grupamentos hidroxila e carbonila em suas cadeias laterais, possivelmente interagindo com Arg206 de APRIL. As mutações G76L, G76F e Q78L foram consideradas visando o aumento da hidrofobicidade, embora sua cadeia

lateral não interaja diretamente com nenhum aminoácido de APRIL. A mutação H81E em T11 foi planejada tendo em vista o aumento da interação eletrostática da tríade DHL, considerando-se a cavidade de potencial positivo no qual esse segmento está inserido. As mutações K98R e K98H foram realizadas de modo a elevar o número de ligações hidrogênio com Asp129 e Asp130 de APRIL, mantendo ainda a ponte salina. Dado que os aminoácidos que formam essa ponte salina estão relativamente expostos ao solvente, com essa mutação, avaliamos se o aumento no número de ligações hidrogênio poderia reforçar a estabilidade da ponte, em detrimento à interação com o solvente. Finalmente, a mutação I92T também foi planejada esperando-se a formação de mais ligações hidrogênio com Arg206 de APRIL.

A localização de cada substituição na estrutura de TACI é mostrada na figura 23.

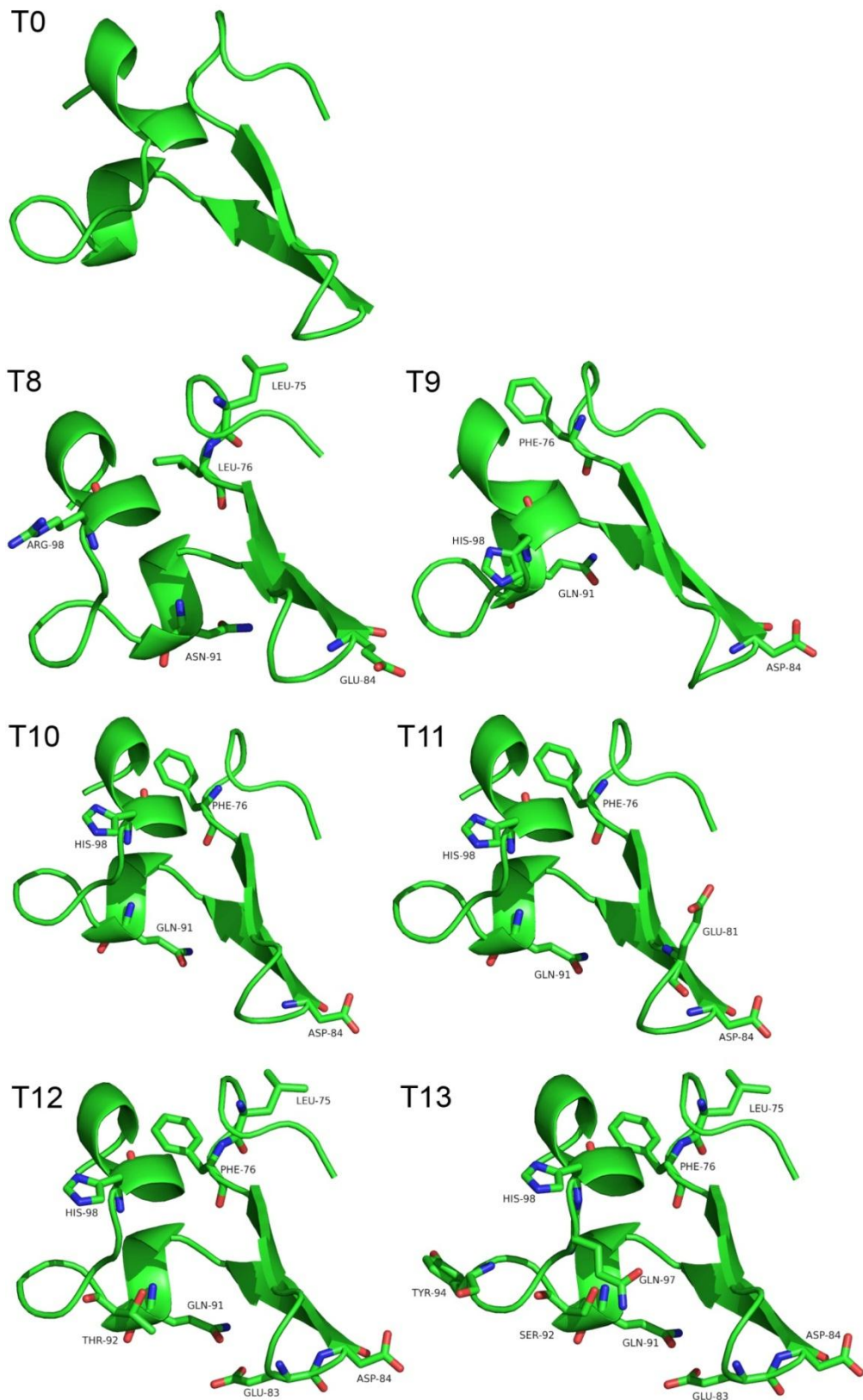


Figura 23 – Representação estrutural de TACI e dos peptídeos mutados, tendo por base a estrutura nativa de TACI. Os aminoácidos representados por bastões e identificados são os que sofreram mutação após as análises da dinâmica molecular. A) T0, B)T8, C)T9, D)T10, E)T11, F)T12, G)T13. Os peptídeos T1, T3, T4, T5, T6 e T7 são os mesmos peptídeos, com a ausência da ponte dissulfeto formada entre Cys71-Cys86.

4.7. Análise da estrutura secundária dos peptídeos mutados

Para a análise da estabilidade da estrutura secundária de T0 a T13 em complexo com APRIL, utilizamos o programa DSSP (Kabsch e Sander, 1983), aplicado ao longo da trajetória de 30ns.

Notamos que, inicialmente, a estrutura secundária de todos os aminoácidos se manteve, persistindo até 6 ns em T4 e T6 (figura 24). T0 se manteve ao longo de toda a simulação. Em T1 observamos a permanência até ~10 ns e em T3 até ~18 ns. T4, após 6 ns perde a estrutura estável do grampo beta entre os resíduos 6 a 18. Embora T5 apresente uma estabilidade maior que os outros mutantes, é claramente observado que a ponte dissulfeto entre Cys71 e Cys86 é necessária para a manutenção da estrutura secundária, já que sua ausência levou a uma desestabilização ao final de 30 ns. T6 manteve a estrutura do grampo beta até 6 ns a a partir desse momento os resíduos 8 a 16 perderam a conformação secundária. Em T7 a região de *beta hairpin* persistiu até 9 ns. A região compreendida entre os resíduos 6 e 18 engloba o grampo beta que contém o motivo DXL.

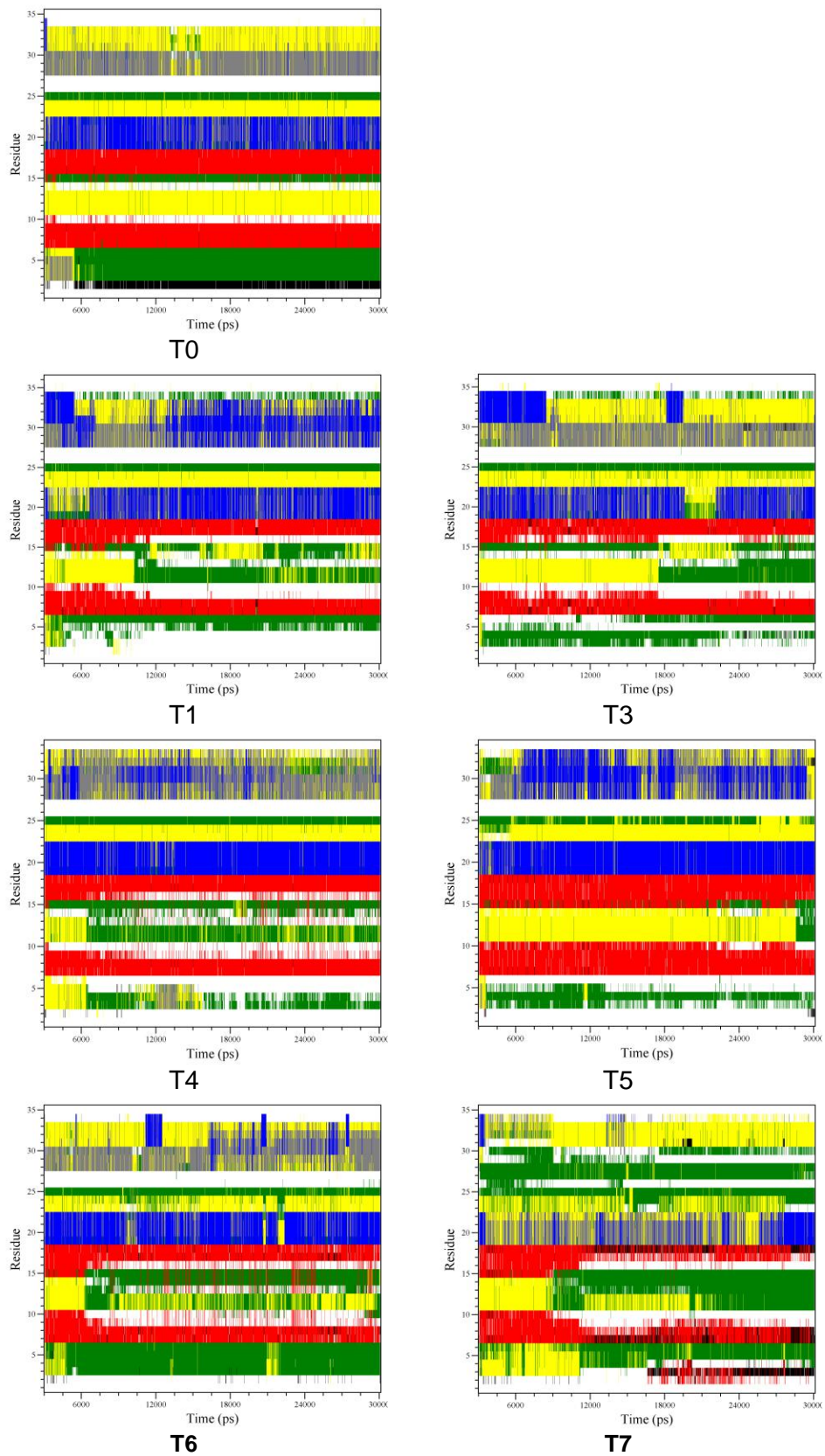


Figura 24 – Estrutura secundária de TAC1 e dos peptídeos mutados, em ausência da ponte dissulfeto Cys71-Cys86, calculada com DSSP. Nota-se claramente na região dos aminoácidos 7-18 o padrão beta hairpin englobando a região DHL. Em todas as proteínas observamos uma desestruturação dessa região, importante para o reconhecimento.

A partir desses resultados, optamos por realizar novas simulações, mantendo a ponte dissulfeto existente entre Cys71 e Cys86. As sequências dos peptídeos denominados T1, T3, T4, T5, T6 e T7, a partir desse momento foram renomeadas para T8, T9, T10, T11, T12 e T13 respectivamente, com a restauração dessa ponte.

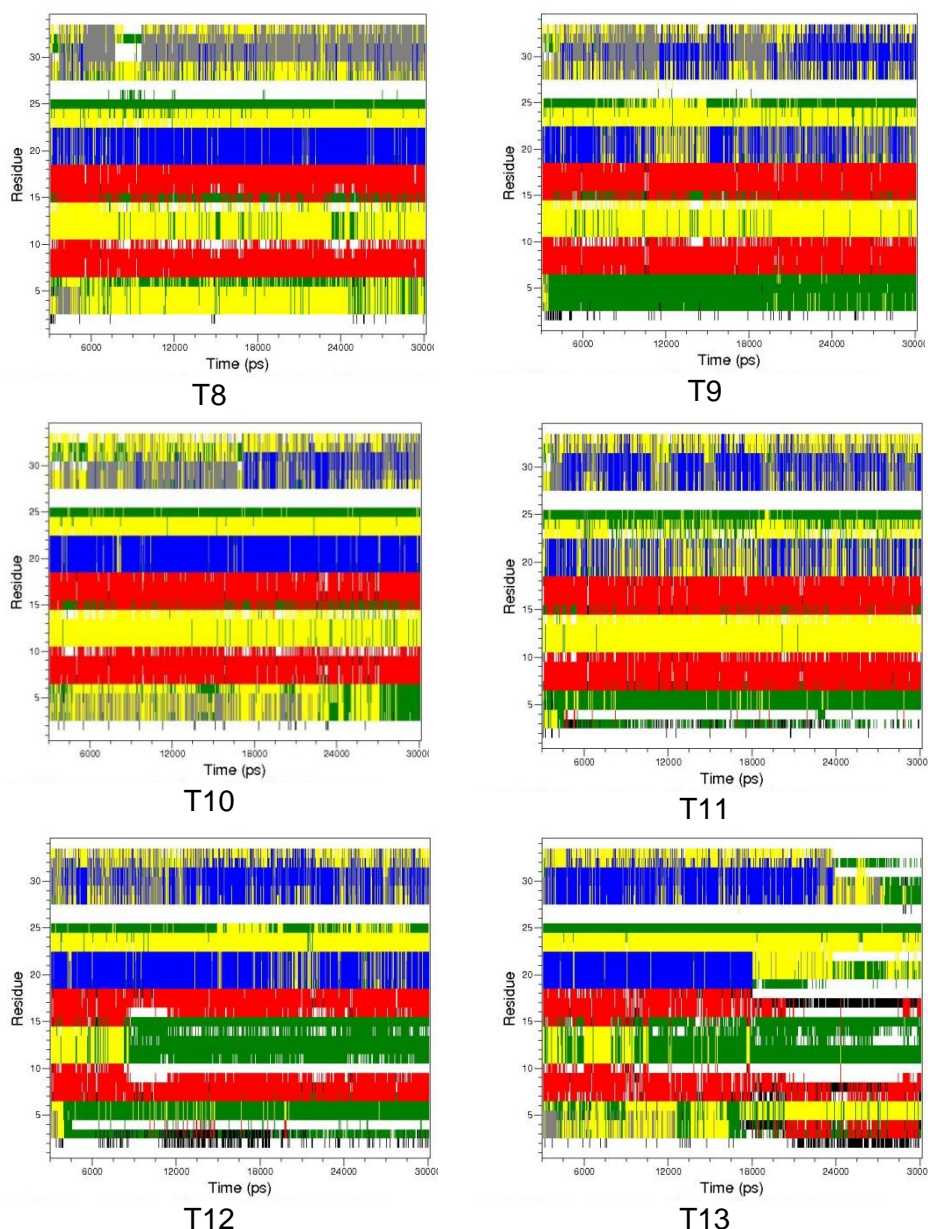


Figura 25 – Análise da estrutura secundária realizada com o programa DSSP durante a dinâmica molecular dos peptídeos T8 a T13 em complexo com APRIL. A região compreendida entre os resíduos 6 e 19 engloba a estrutura em *beta hairpin* onde se encontra o principal sítio de interação com APRIL. A manutenção da ponte dissulfeto existente entre Cys71 e Cys86 conservou a estrutura nativa dessa região, além de confirmar a possibilidade da expressão do peptídeo sem perda da estrutura terciária.

Os resultados da análise da estrutura secundária realizados durante a dinâmica com esses peptídeos se encontram na figura 25.

É notável o papel relevante da ponte dissulfeto removida nas sequências T1-T7. Ao realizar a análise da estrutura secundária nos peptídeos com a ponte dissulfeto presente, somente T12 e T13 perderam a estrutura inicial, provavelmente devido a outras alterações sofridas em sua estrutura.

4.8. Potenciais eletrostático e de Lennard-Jones

O potencial de Lennard-Jones, também conhecido como potencial 6-12, é uma aproximação matemática para a descrição dos efeitos atrativos produzidos pelas forças de Van der Waals e a repulsão entre os elétrons dos orbitais atômicos e moleculares. Esse potencial, formado entre pares de átomos ou moléculas, é composto por dois termos: o termo repulsivo (r^{-12}), que descreve a repulsão de Pauli entre nuvens eletrônicas de átomos próximos, e o termo atrativo de longo alcance (r^{-6}), que descreve a atração entre átomos afastados. O potencial de Lennard-Jones é um bom modelo devido à sua simplicidade e é particularmente preciso para átomos e moléculas neutros, sendo por essa razão, extensamente aplicado em programas de dinâmica molecular.(Schlick, 2010)

O potencial eletrostático é descrito pelo potencial de Coulomb, que representa a interação entre átomos carregados. O potencial de Coulomb assume um valor positivo se os átomos têm a mesma carga e negativo caso apresentem cargas opostas.(Schlick, 2010)

O cálculo do potencial de Coulomb da interação entre os peptídeos e APRIL mostrou energias menores para os peptídeos quando ligados a APRIL do que a BAFF,

embora tenha sido observada também uma diminuição do potencial eletrostático dos peptídeos no último caso. É importante notar que TACI em sua forma nativa (T0) apresentou energias comparáveis para APRIL e BAFF no início das dinâmicas, porém, durante a simulação, a energia reduziu de forma marcante, situando-se em torno de -100 a -60 kcal/mol em APRIL, enquanto que em BAFF a energia se estabilizou em \sim -30 kcal/mol (figura 26).

Todos os peptídeos mostraram energias de interação eletrostática negativas. Porém, foi possível notar um aumento nos valores dessa interação nos peptídeos T8 a T12, tendo somente T13 uma energia de interação similar a T0.

É notável a diferença do potencial de T0 para APRIL ($-98,5 \pm 17$ kcal/mol) e para BAFF ($-45,6 \pm 11$ kcal/mol), sendo talvez a interação eletrostática um dos fatores principais que influenciam a afinidade de TACI por ambos os ligantes.

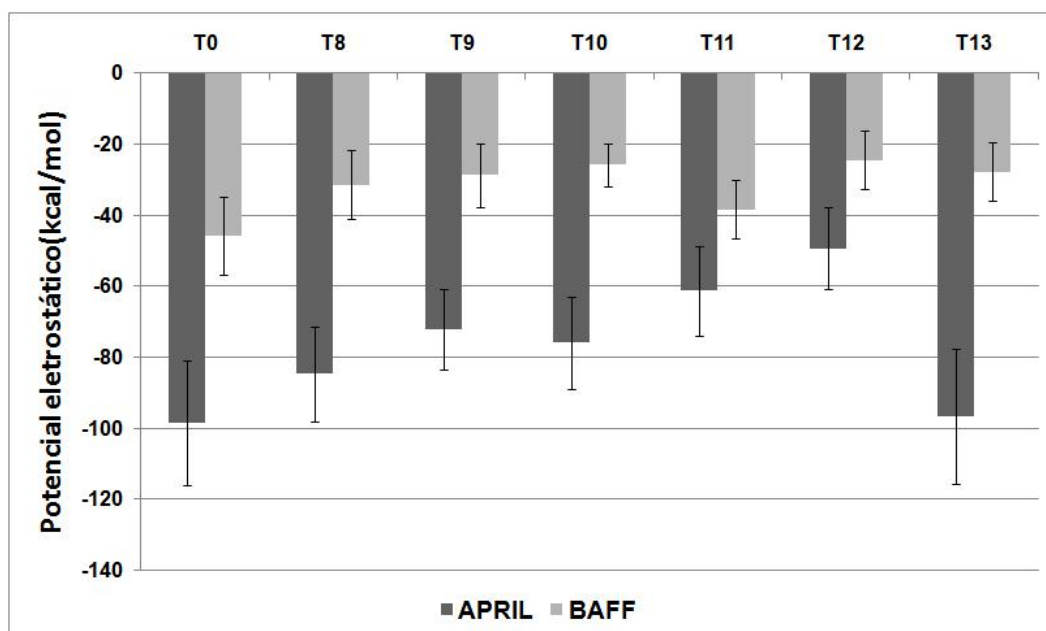


Figura 26 - Potencial eletrostático dos peptídeos complexados a APRIL e BAFF.

É importante notar que a razão entre os valores de energia potencial eletrostática é pelo menos duas vezes menor para APRIL do que para BAFF, para todos os

peptídeos. Já as diferenças das energias eletrostáticas com o controle T0, para APRIL foram maiores que para BAFF, o que sugere que esse termo seja de maior preponderância no primeiro caso.

No caso da energia potencial de Lennard-Jones (figura 27), todos os peptídeos mostraram energias de interação negativas, porém foi possível notar uma diminuição nos valores dessa interação nos peptídeos T8 a T13 para APRIL e bem menos expressiva em T8 a T11 para BAFF.

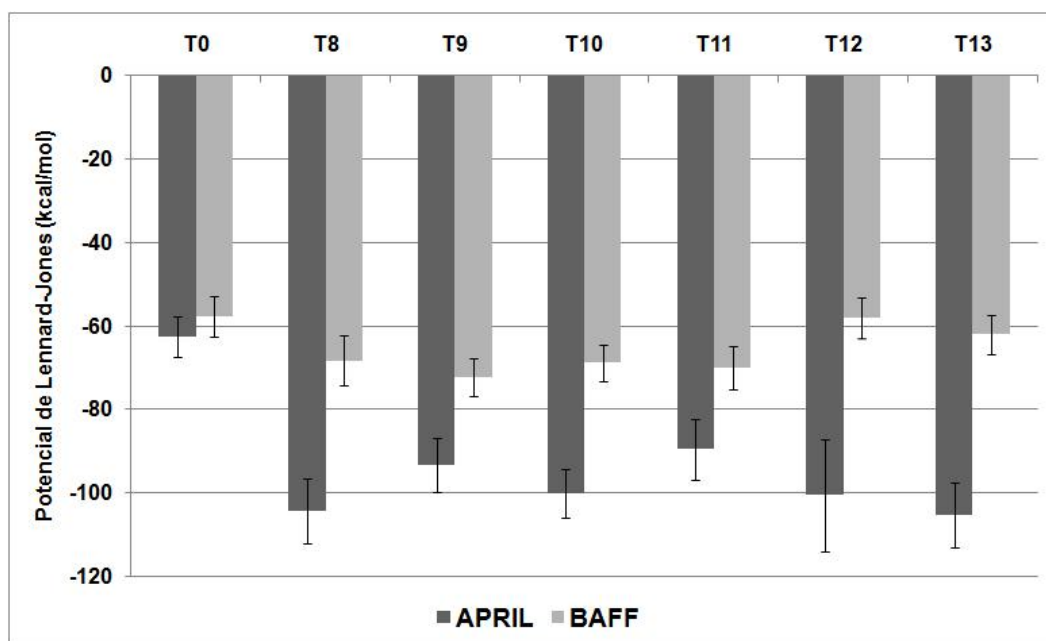


Figura 27 - Potencial de Lennard-Jones dos peptídeos complexado a APRIL e BAFF.

Dado que os peptídeos sofreram uma diminuição da energia de Lennard-Jones e simultaneamente um aumento da energia eletrostática, podemos sugerir que o termo apolar parece ter uma relevância maior para a interação dos peptídeos com APRIL.

Para a interação APRIL-peptídeos, esse potencial variou de -93,2 kcal/mol (T9) a -105,2 kcal/mol (T13). O receptor TACI (T0) apresentou uma energia potencial de

-62,5 kcal/mol. Todos os peptídeos apresentaram valores menores que o receptor nativo, mostrando que as mutações propostas em T8 a T13 foram favoráveis, melhorando a interação com APRIL.

4.9. *Análise das ligações hidrogênio*

As ligações hidrogênio são consideradas fracas isoladamente. Porém a associação de um grande número dessas ligações é responsável por grande parte do reconhecimento molecular entre ligantes e receptores proteicos, além da manutenção da estrutura secundária das proteínas.(Brändén e Tooze, 1991) A formação dessa ligação se dá entre átomos de hidrogênio ligados covalentemente a átomos eletronegativos que fazem parte da estrutura proteica com outros átomos eletronegativos como, por exemplo O, N, F.

A energia relacionada a uma única ligação, separadamente, é estimada em cerca de 5 kcal/mol (Sheu, Yang et al., 2003). No entanto, a combinação de até dezenas de ligações na interface de contato entre duas ou mais proteínas é capaz de multiplicar a energia de ligação, tornando as ligações de hidrogênio determinantes para o aumento da afinidade.(Böhm e Schneider, 2003)

As mudanças propostas nos peptídeos T1 a T13 foram sugeridas em função da melhora da complementaridade e da interação entre esses peptídeos mutados e APRIL. Parte das mutações foi realizada visando o aumento na formação das ligações hidrogênio (figura 28).

Nº TACI	Nº APRIL
T0	
<i>R84</i>	<i>T79</i>
<i>L83</i>	<i>R82</i>
<i>S91</i>	<i>R230</i>
<i>I92</i>	<i>R230</i>
T8	
<i>R474</i>	<i>D153, S155, D156</i>
<i>E460</i>	<i>R219, H402</i>
<i>N467</i>	<i>D366, R367</i>
T9	
<i>Asp496</i>	<i>His128, Arg356</i>
<i>Gln503</i>	<i>H90, D92, R93</i>
<i>His510</i>	<i>Asp293</i>
T10	
<i>Asp460</i>	<i>Arg219, Ser400, His402</i>
<i>Gln467</i>	<i>Asp366</i>
<i>His474</i>	<i>Asp156, Ala256</i>
T11	
<i>Glu491</i>	<i>Pro391</i>
<i>Asp494</i>	<i>His128, Arg356,</i>
<i>Gln501</i>	<i>His80, Arg93</i>
<i>His508</i>	<i>Asp293, Ala393</i>
T12	
<i>Glu458</i>	<i>Arg356</i>
<i>Gln466</i>	<i>Asp92, Arg93</i>
<i>His473</i>	<i>Ala393</i>
T13	
<i>Asp493</i>	<i>Arg82, His265</i>
<i>Gln500</i>	<i>Asp229, Arg230</i>
<i>His507</i>	<i>Ala119</i>

Figura 28 – Relação de ligações hidrogênio entre os peptídeos e APRIL. A numeração de APRIL corresponde à sequência do trímero.

Para confirmar a permanência das ligações de hidrogênio, analisamos o número de ligações formadas e mantidas ao longo de 30ns de simulação. Em todos os peptídeos houve um aumento considerável do número de ligações, quando comparados a T0. O número de interações formadas em T0 é de $6,5 \pm 2,5$. O número

de ligações hidrogênio para os peptídeos mutados foram: T8=11,7±3,4, T9=11,8±3, T10=10,6±2,9, T11=8,8±2,7, T12=9,4±3,2 e T13=15,2±3,9.

Os peptídeos T8 a T12 exibiram aumento significativo do número de ligações para APRIL, concomitantemente a uma diminuição para BAFF (figura 29 e figura 30). A análise da evolução temporal, comparando o número de ligações de hidrogênio em ambos os complexos, indicou claramente o aumento intencionado nas ligações relacionadas. As médias de ligações de hidrogênio analisadas para ambos os ligantes são apresentadas na tabela 6. O aumento expressivo encontrado em T13 pode ser atribuído à perda da estrutura secundária, como observado na figura 24. Por essa razão, esse peptídeo foi considerado ineficaz, por ser incapaz de interagir especificamente com APRIL.

Tabela 6 – Número médio de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e os ligantes.

Peptídeo	APRIL	BAFF
T0	6,5±2,5	2,8±1,7
T8	11,7±3,4	3,5±1,8
T9	11,8±3	5,3±2,2
T10	10,6±2,9	4,9±2
T11	8,8±2,7	4,6±2,1
T12	9,4±3,2	2,9±1,8
T13	15,2±3,9	7,5±2,8

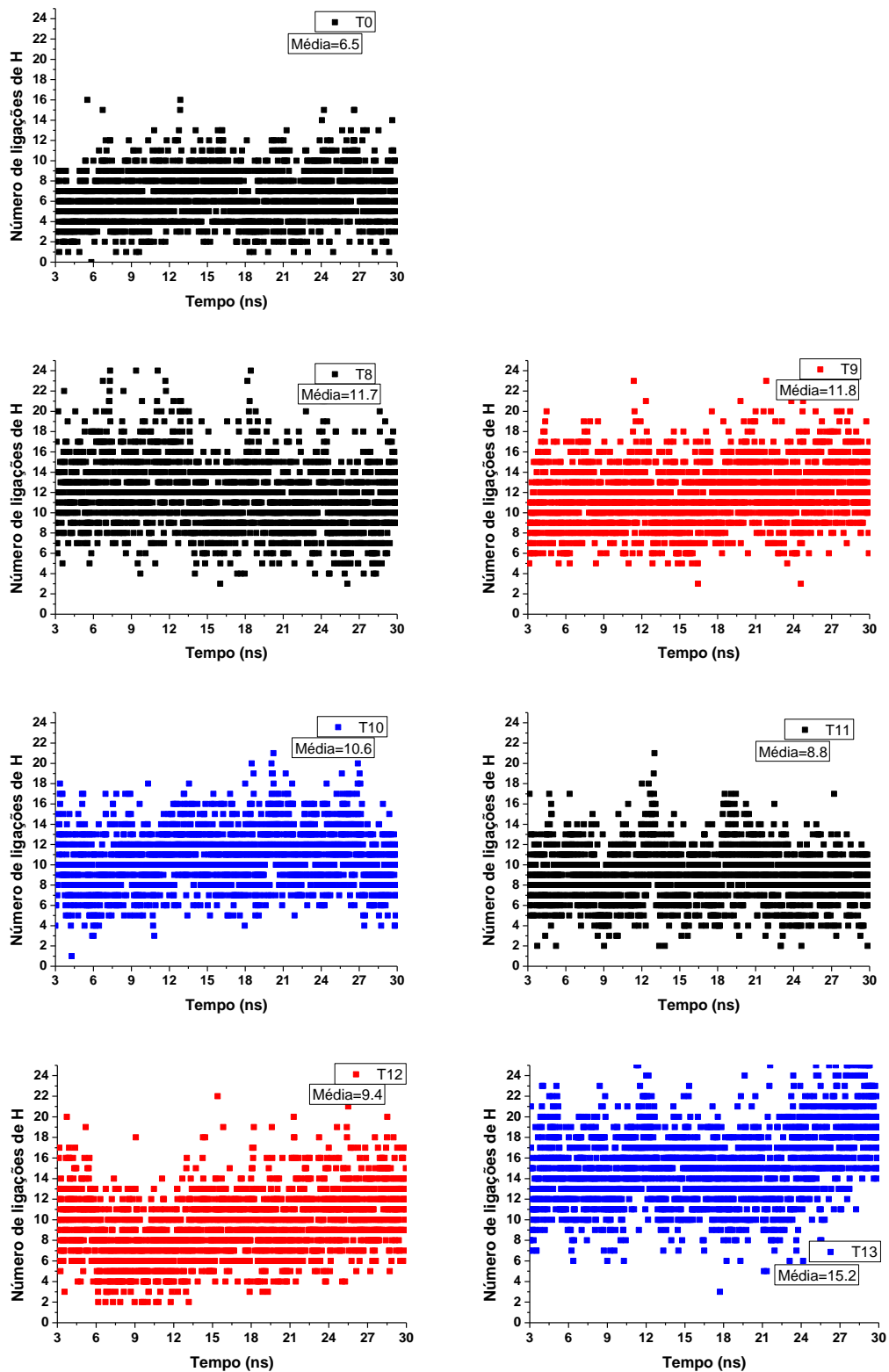


Figura 29 – Número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e APRIL ao longo do tempo. Na caixa de texto são apresentadas também as médias de ligações formadas.

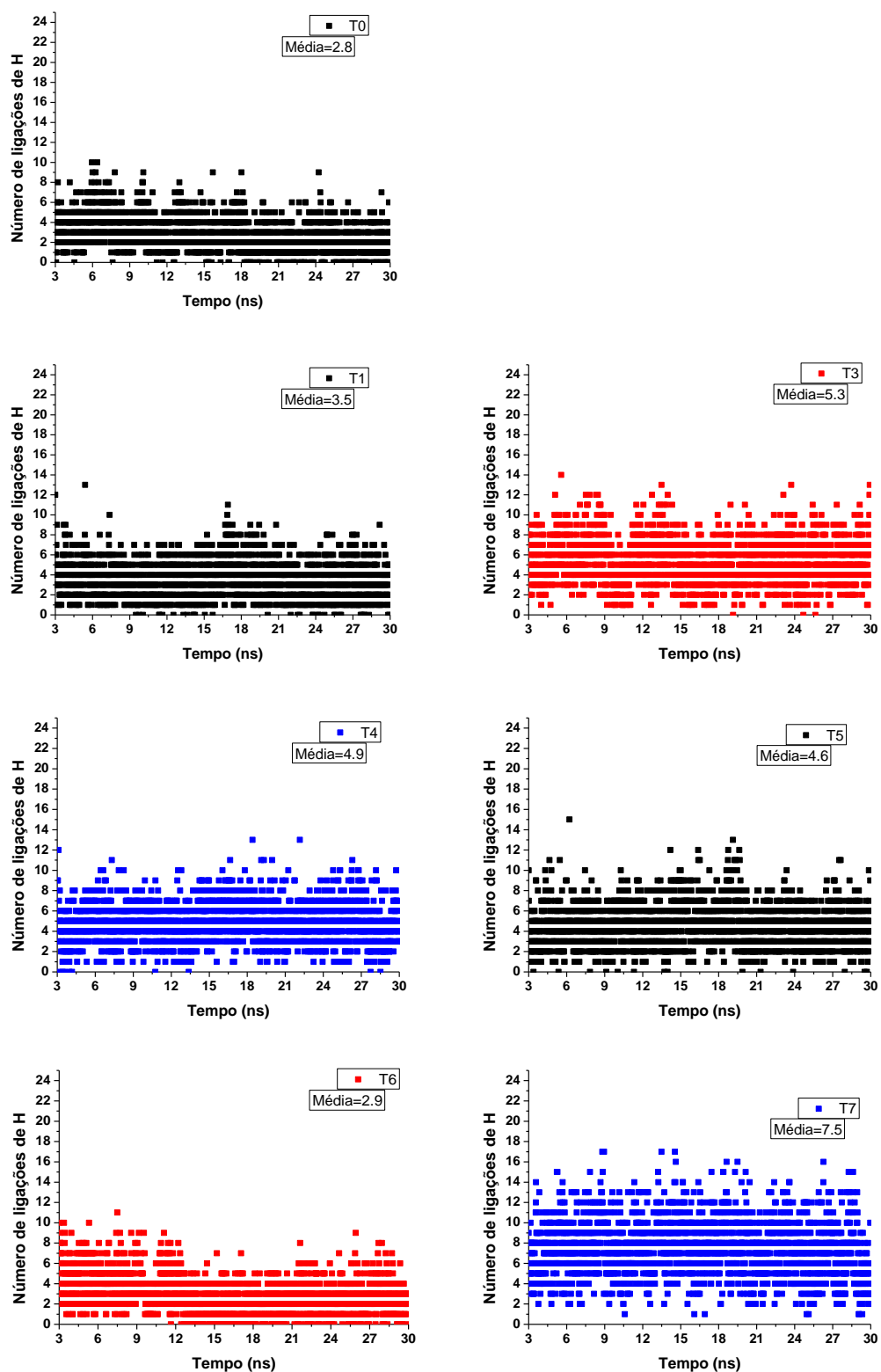


Figura 30 – Número de ligações de hidrogênio formadas entre os peptídeos e BAFF durante a dinâmica. São apresentadas também as médias de ligações formadas.

4.10. Raiz do desvio quadrático médio (RMSD)

O gráfico do RMSD em função do tempo está representado na figura 31. A análise do RMSD calculado para os C α tomando como referência a conformação do peptídeo após a termalização (t=3 ns) mostrou a estabilidade dos peptídeos durante as simulações de dinâmica molecular. Os valores médios se encontram na tabela 7.

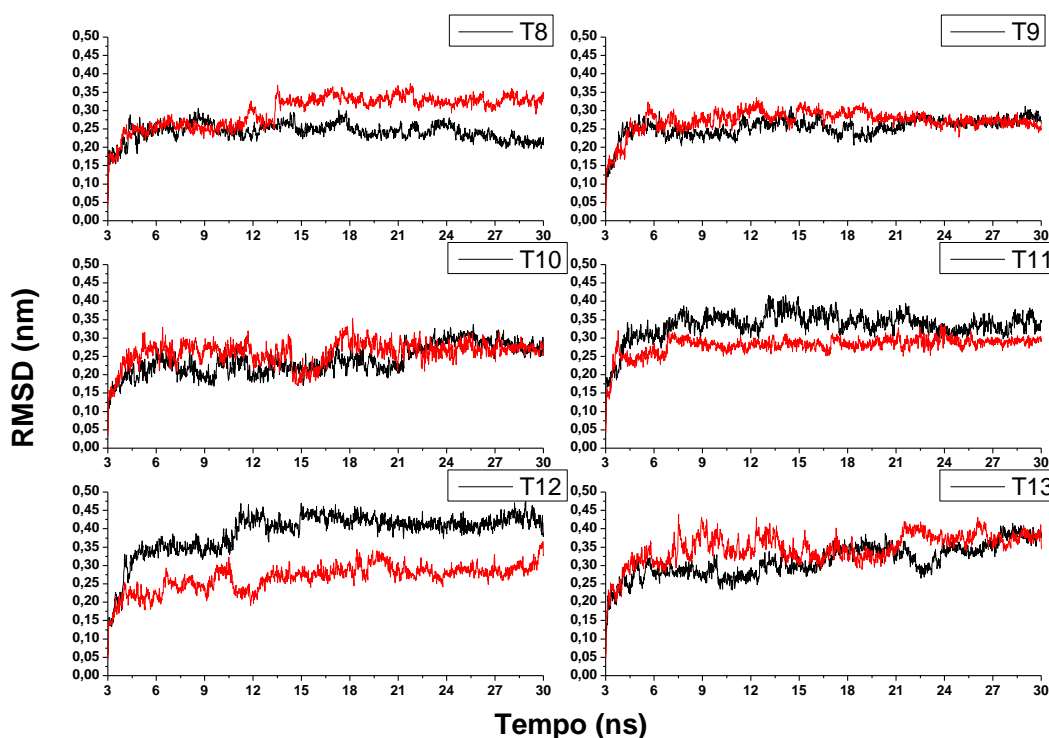


Figura 31 – Raiz do desvio quadrático médio calculado para os C α de T8 a T13 em complexo com APRIL (linha preta) e BAFF (linha vermelha), considerando como referencial a estrutura inicial. Não são mostrados os primeiros 3 ns, referentes a minimização de energia.

Os peptídeos T8, T9 e T10 mostraram uma flexibilidade menor que T11, T12 e T13 quando complexados a APRIL, provavelmente devido à permanência da estrutura secundária por um tempo maior, como descrito através do DSSP. Em T12 observamos uma variação de RMSD de até 0,47 nm em relação à estrutura inicial.

A menor variação foi observada em T8, não ultrapassando 0,30 nm durante os 30 ns de simulação. T8, T9 e T10 atingiram a estabilidade mais rapidamente, após o aumento inicial devido ao relaxamento do sistema.

Os peptídeos T10, T12 e T13 complexados a BAFF mostraram uma flexibilidade estrutural menor do que a observada em APRIL, enquanto T13 manteve a mesma amplitude de variação (até 0,40 nm), quando comparados ambos os ligantes. Em T9 e T11 observamos uma flutuação similar para APRIL e BAFF, com variação de aproximadamente 0,03 nm.

Tabela 7 – Valores médios de RMSD encontrados durante a dinâmica molecular com os peptídeos, acompanhados do desvio padrão.

	APRIL	BAFF
T8	0,24±0,02	0,30±0,04
T9	0,25±0,03	0,27±0,03
T10	0,24±0,04	0,26±0,03
T11	0,39±0,06	0,28±0,02
T12	0,31±0,04	0,27±0,04
T13	0,34±0,04	0,35±0,04

4.11. Análise de pontes salinas entre complexos peptídeo/APRIL e peptídeo/BAFF

Observamos uma recorrência de vários resíduos envolvidos na formação de pontes salinas estáveis em APRIL (figura 32) e BAFF (figura 33). Consideramos para essa análise somente as pontes salinas intermoleculares formadas por resíduos de cargas opostas mantidas entre 0,35 e 0,45 nm.

Os resíduos nas posições 80 e 84 de TACI apareceram com maior frequência que os outros resíduos encontrados nas posições correspondentes aos aminoácidos Lys98, Asp85, Lys73, Glu83 e Arg72. A existência de quatro pontes salinas entre T13 e APRIL pode ser resultado da perda de estrutura secundária, para esse sistema.

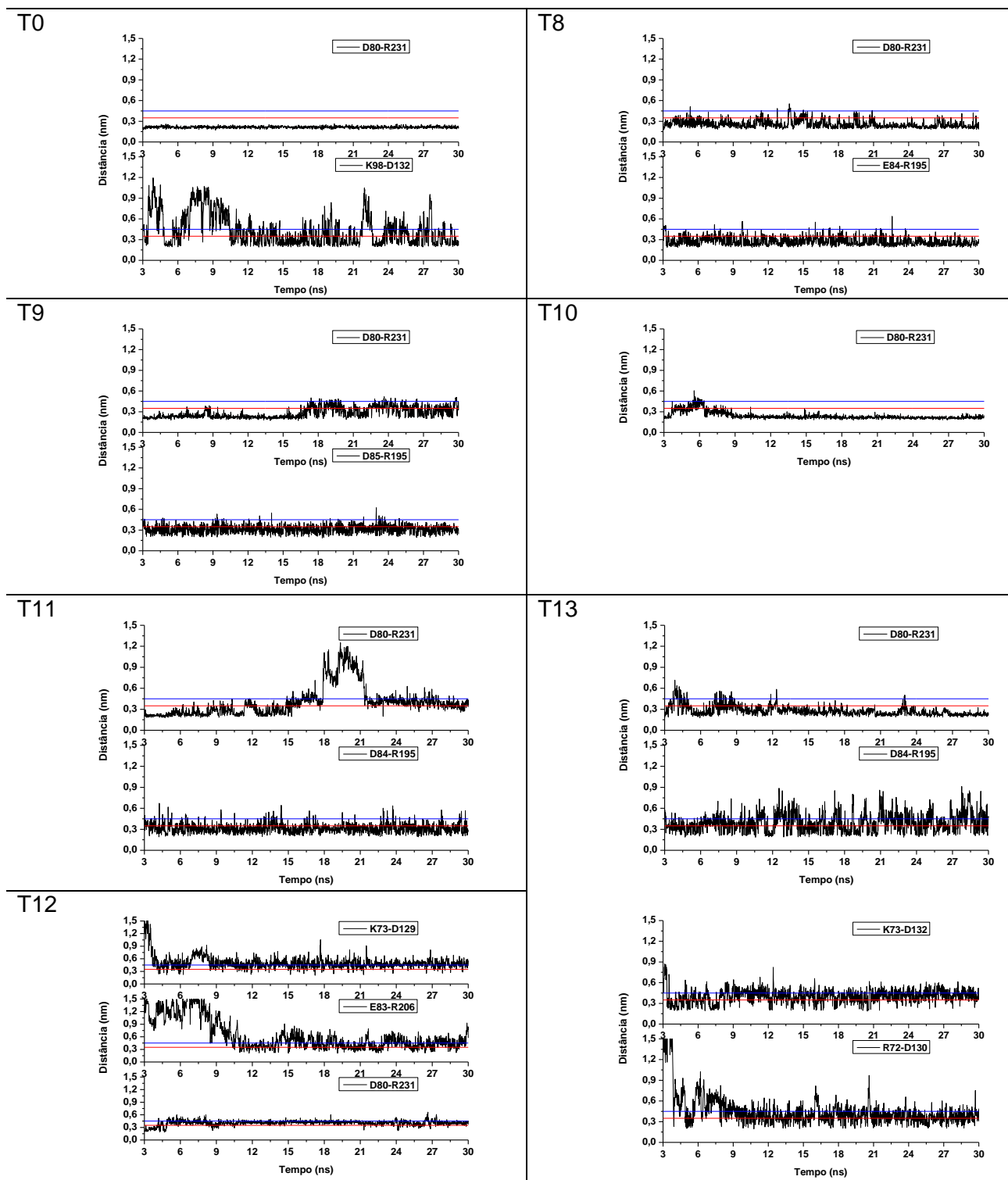


Figura 32 – Estabilidade das pontes salinas encontradas entre os peptídeos mutados e APRIL.
 Distância entre os resíduos formadores de pontes salinas encontradas entre os peptídeos e APRIL.

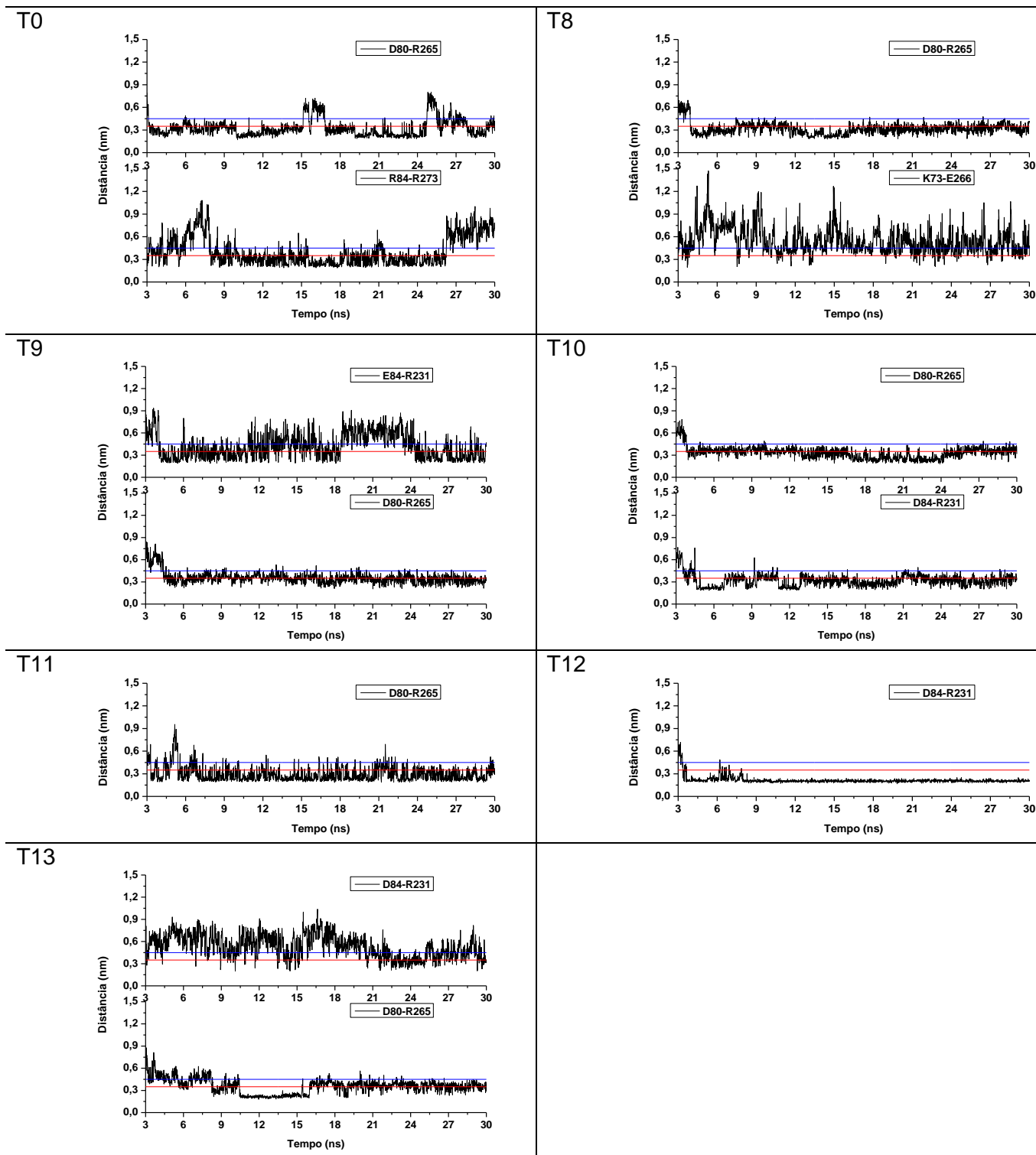


Figura 33 - Estabilidade das pontes salinas encontradas entre os peptídeos mutados e BAFF.
 Distância entre os resíduos formadores de pontes salinas encontradas entre os peptídeos e BAFF.

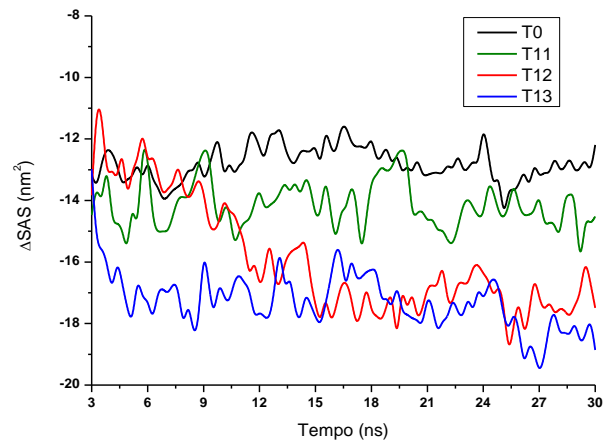
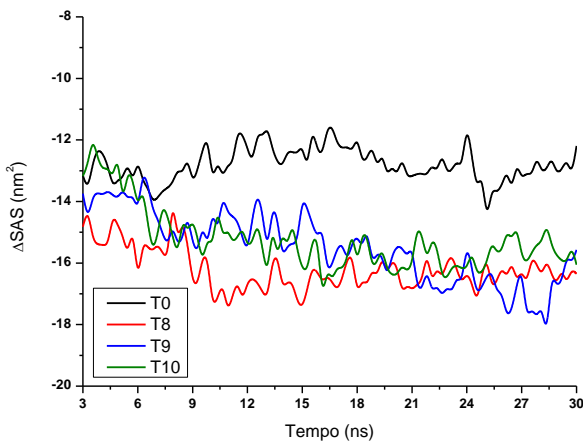
É de especial importância a existência de seis possíveis pontes salinas em APRIL (Asp129, Asp 130, Asp 132, Arg195, Arg206 e Arg231), enquanto para BAFF somente quatro são detectadas na dinâmica (Arg231, Arg265, Glu266 e Arg273). Essa diferença pode ser explorada de maneira direta no desenho de próximas sequências antagonistas de APRIL.

4.12. Análise da superfície acessível ao solvente dos peptídeos associados a APRIL e BAFF

Para avaliar o grau de entrosamento dos peptídeos com APRIL e BAFF, analisamos a superfície acessível ao solvente após a dinâmica molecular. Calculamos a variação da área da superfície acessível (Δ SAS), subtraindo a área ocupada pelo complexo peptídeo-ligante da soma das áreas do peptídeo e do ligante separadamente. Em trabalhos anteriores sobre interação proteína-proteína, sugeriu-se que um menor valor da área acessível ao solvente menor seria indicativo de uma maior afinidade entre os ligantes interagentes. (Tuncbag, Nurcan, Gursoy, Attila *et al.*, 2009)

Nossa observação inicial foi a diferença entre as áreas de T0 em complexo com APRIL e BAFF (figura 34). A Δ SAS calculada em APRIL foi, em geral, menor que a Δ SAS de BAFF. A Δ SAS de todos os peptídeos mutados se mostrou menor que a proteína selvagem, indicando que esses peptídeos interagiriam mais estreitamente com APRIL do que o controle. Comportamento oposto foi observado em BAFF. Exceto por T9 e T11, que mostraram uma Δ SAS similar à proteína selvagem, todos os peptídeos mostraram uma área acessível maior que a calculada no controle. Esses indícios em conjunto nos levaram a crer que a interação entre os peptídeos e APRIL ocorreria de forma mais favorável quando comparada a BAFF.

APRIL



BAFF

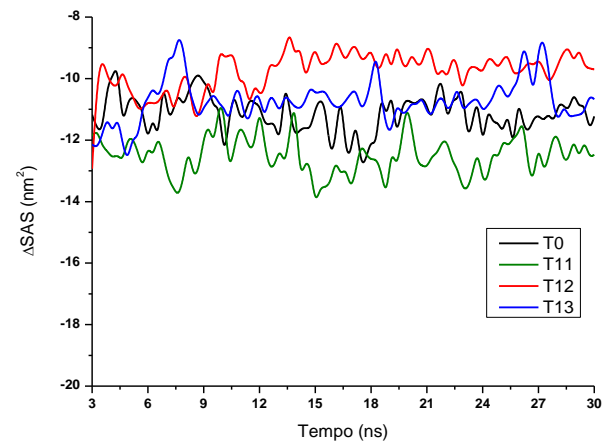
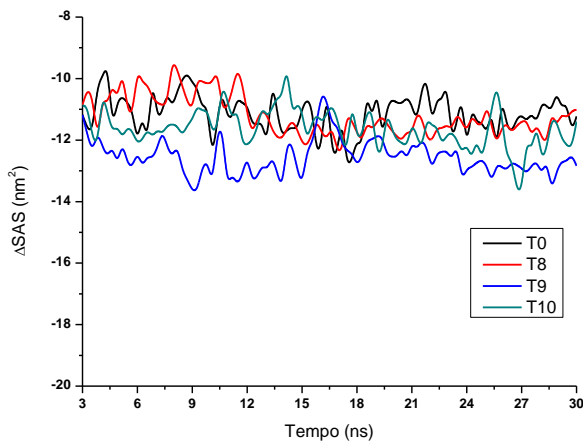


Figura 34 – Superfície acessível ao solvente calculada após a dinâmica com o GROMACS. Gráficos A e B: Complexo peptídeo/APRIL; C e D: Complexo peptídeo/BAFF. Em todos os gráficos foi mantido o controle T0.

4.13. Resultados do ELISA competitivo

Para validar a eficiência dos peptídeos desenhados, realizamos, em parceria com nosso grupo colaborador no Instituto de Genética Molecular de Montpellier, uma série de ensaios imunoenzimáticos após a clonagem desses peptídeos mutados. Foram selecionados os quatro peptídeos mais favoráveis ao bloqueio de APRIL, de acordo com o conjunto de análises feitas computacionalmente. Os peptídeos T8, T9,

T10 e T11 foram propostos para a clonagem e expressão, para prosseguimento dos testes biológicos.

O sucesso da transfecção foi testado através de *immunoblotting* com o sobrenadante das células transfectadas com os plasmídeos isolados das bactérias competentes. O peso molecular estimado de TACI e dos peptídeos mutados é de 55 KD. Logo, a banda observada na fração equivalente a esse peso corresponde aos peptídeos, enquanto a banda mais espessa, em 70 KD corresponde à Ig (figura 35).

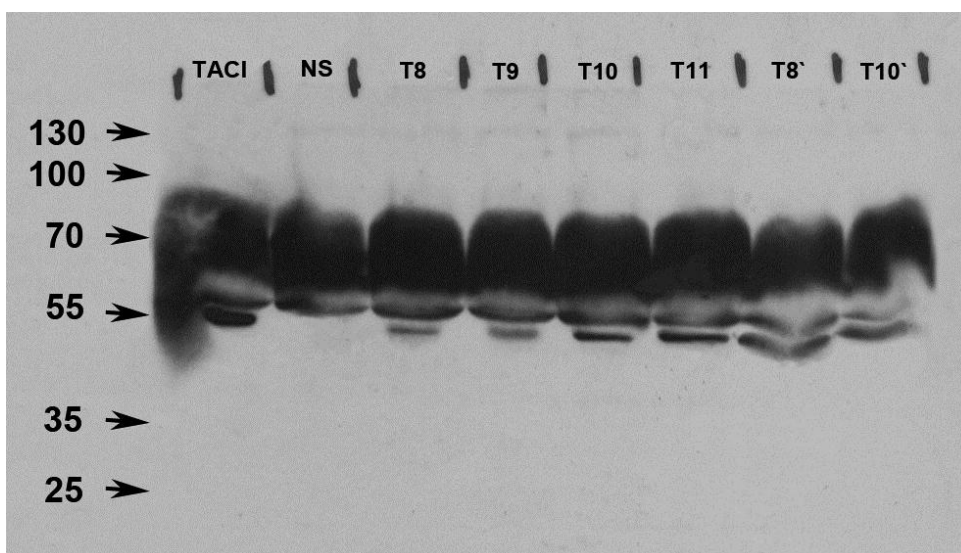


Figura 35 – Immunoblotting para detecção de TACI e peptídeos mutados. Os números à esquerda mostram o peso conforme o padrão molecular. A banda larga em 70 kDa corresponde a Ig acoplada aos receptores. A banda em 55 kDa corresponde a TACI e aos peptídeos mutados. T8 e T10 nas duas últimas colunas à direita correspondem ao sobrenadante de células transfectadas com o DNA obtido em uma segunda *midi prep*. A revelação foi feita com anti-IG FC.

As sequências foram acopladas à Ig para viabilizar a detecção por anti-Ig, enquanto a expressão desses clones se deu em células HEK-293T, originárias de rim embrionário humano. A eficácia foi estimada de acordo com a densidade ótica medida em 490 nm.

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos com diferentes combinações de peptídeos mutados, *coating* e APRIL de duas diferentes origens (Alexis e *home made*). Como *coating* foi utilizado TACI ou BCMA, dois receptores de APRIL e BAFF. TACI e as proteínas mutantes derivadas foram produzidas de acordo com o protocolo descrito na metodologia. TACI comercial (Alexis, Enzo Life Sciences, France) foi utilizado em alguns experimentos, assim como TACI produzido e purificado no laboratório.

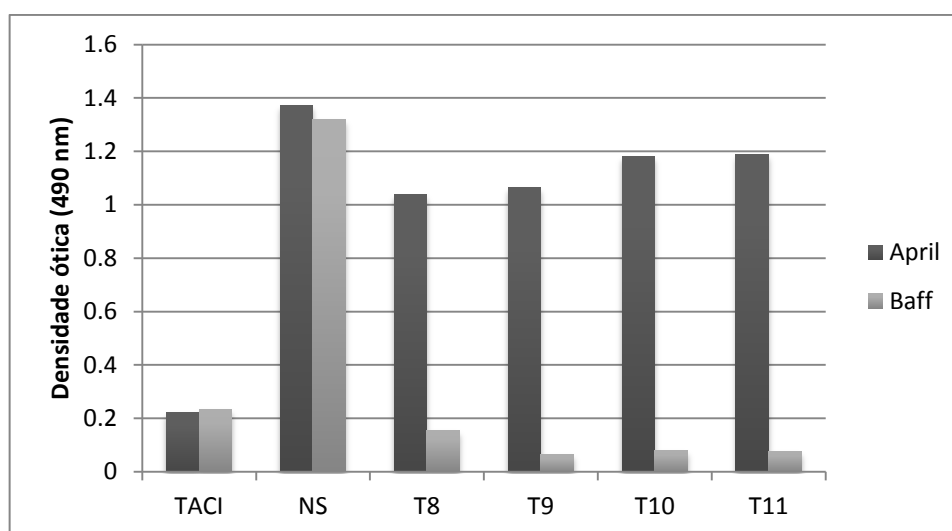


Figura 36 – ELISA competitivo com BCMA como *coating* e efeito inibitório em APRIL e BAFF. NS: sobrenadante de cultura celular não transfectada. O gráfico mostra o resultado de um experimento. TACI, o controle positivo, se liga aos dois ligantes de maneira similar, impedindo o efeito colorimétrico. O sobrenadante não produz nenhum efeito, enquanto o sobrenadante dos peptídeos T8, T9, T10 e T11 impede a interação de BAFF com BCMA.

Os valores de densidade ótica (DO) indicam o efeito inibitório dos peptídeos, que competem pelo sítio de ligação entre BCMA e APRIL/BAFF. Valores menores que os encontrados no controle T0 são indicativos de que o efeito de inibição foi mais eficaz, enquanto valores maiores apontam uma tendência contrária.

Nos ensaios preliminares realizados com TACI e com os peptídeos mutados, mantivemos também o domínio TMD (figura 37) presente em TACI, próximo ao CRD

TACI_D2). Os resultados desse experimento se encontram na figura 36. O domínio TMD presente em TACI já foi descrito como um domínio importante para o aumento da afinidade desse receptor com seus ligantes. (Ingold, Zumsteg *et al.*, 2005)

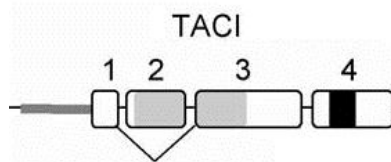


Figura 37 – Estrutura do gene que codifica TACI. As regiões marcadas em cinza são os domínios ricos em cisteína. A região ressaltada em preto compõe o domínio transmembranar. Os números representam os éxons. O domínio CRD1 (TACI_D1) está situado no segundo éxon, enquanto o CRD2 se situa no terceiro.

A DO desses experimentos apontou que os mutantes inibiam BAFF com maior intensidade que APRIL. T8, T9, T10 e T11 pareceram ter um efeito específico em BAFF. Posteriormente a concentração de BAFF foi ajustada para comparação direta com APRIL. O volume aplicado não continha a mesma concentração das duas proteínas, obrigando a realização de ELISA para medição da curva de concentração.

Após o ajuste da concentração de APRIL e BAFF, o experimento foi repetido sob as mesmas condições. A mesma concentração de T0 (TACI) impediu a interação de APRIL e BAFF com BCMA adsorvido à placa (figura 38). O sobrenadante de células não transfectadas não mostrou a inibição observada no controle positivo. Os peptídeos T8, T9 e T10 pareceram inibir de maneira similar APRIL e BAFF. T11 apontou uma inibição mais eficaz de APRIL, porém claramente com baixa especificidade.

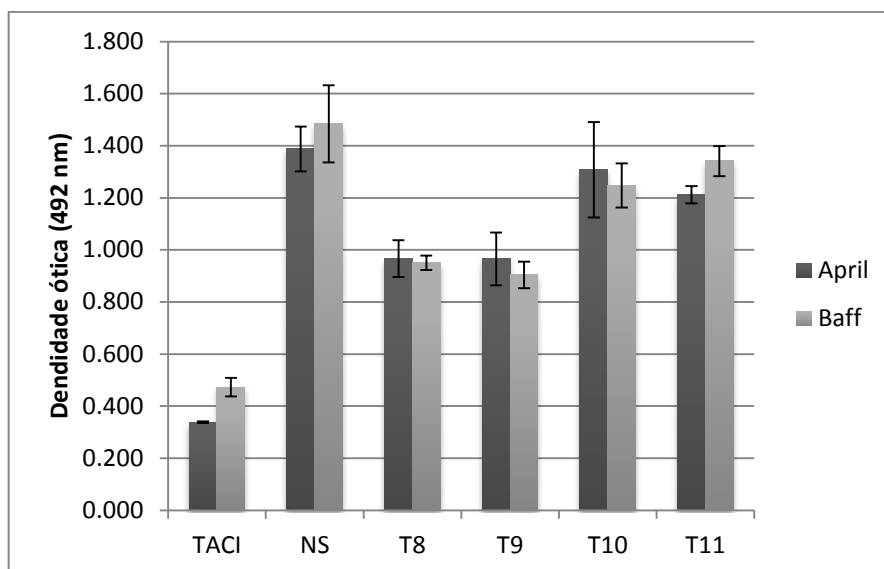


Figura 38 – Elisa competitivo tendo como receptores TACI, e os peptídeos T8, T9, T10 e T11, usando BCMA como *coating*. Médias de três experimentos realizados sob as mesmas condições. O *coating* utilizado foi o BCMA. As barras de erro mostram o desvio padrão. NS: sobrenadante do meio de cultura não transfectado.

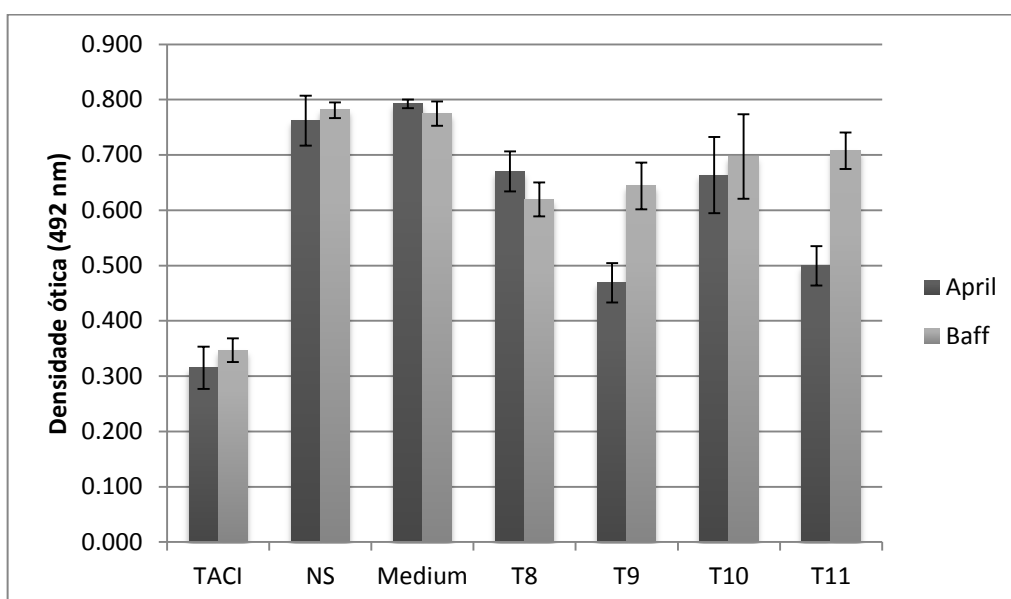


Figura 39 - Elisa competitivo tendo como receptores TACI, e os peptídeos T8, T9, T10 e T11, usando TACI como *coating*. O gráfico mostra as médias de três experimentos realizados sob as mesmas condições. TACI foi utilizado como *coating*. As barras de erro mostram o desvio padrão. NS: sobrenadante do meio de cultura não transfectado; Medium: Meio de cultura.

Utilizando TACI como *coating*, o efeito inibitório foi similar. T9 e T11 mostraram uma ligeira seletividade por APRIL, enquanto T8 e T10 não mostraram efeito específico quando comparados ao controle negativo (figura 39). Esses resultados nos levaram

a buscar explicações alternativas para a quase total falta de inibição dos peptídeos T8 e T10.

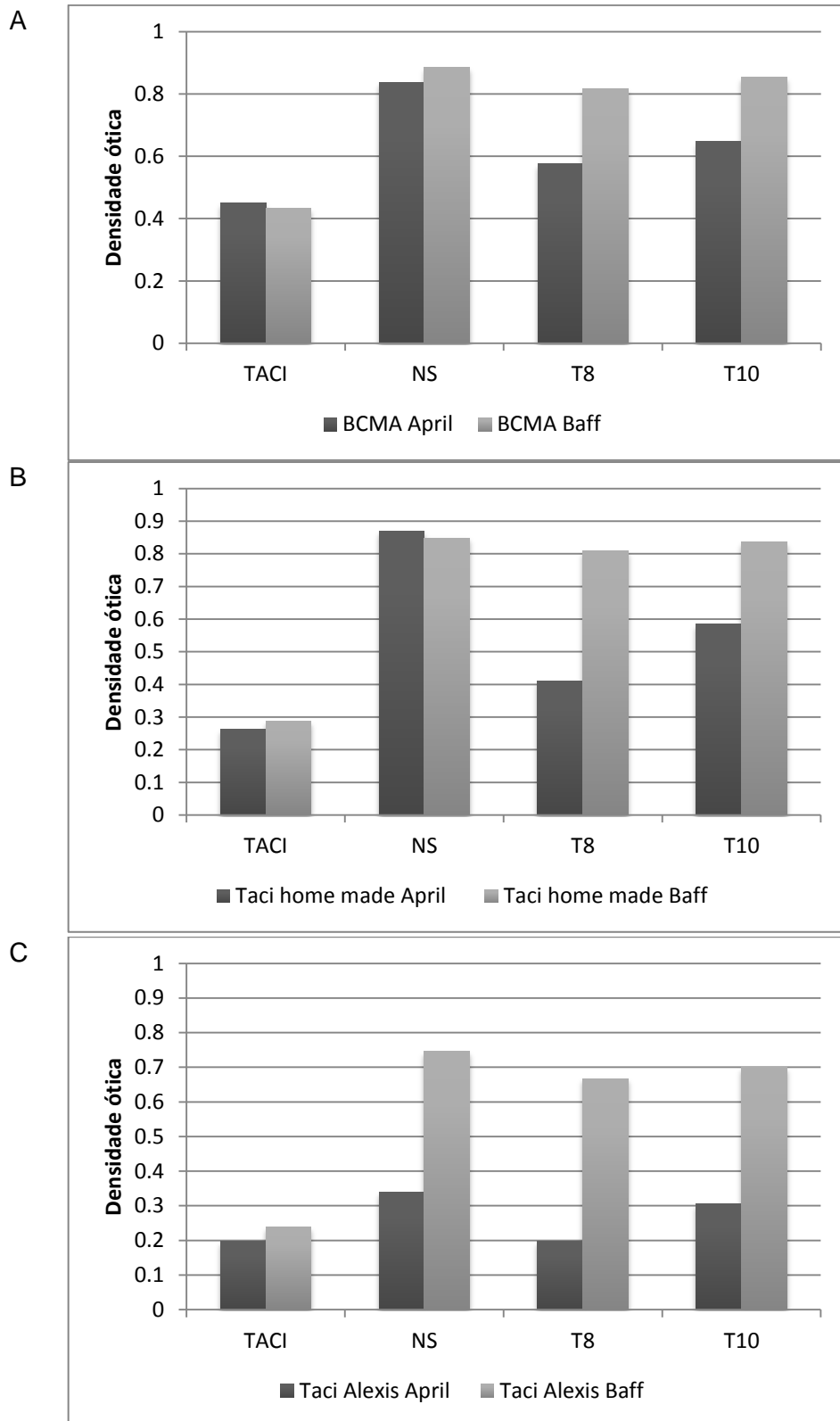


Figura 40 – Elisa competitivo usando BCMA, TACI (Alexis) e TACI purificado no laboratório (*home made*).

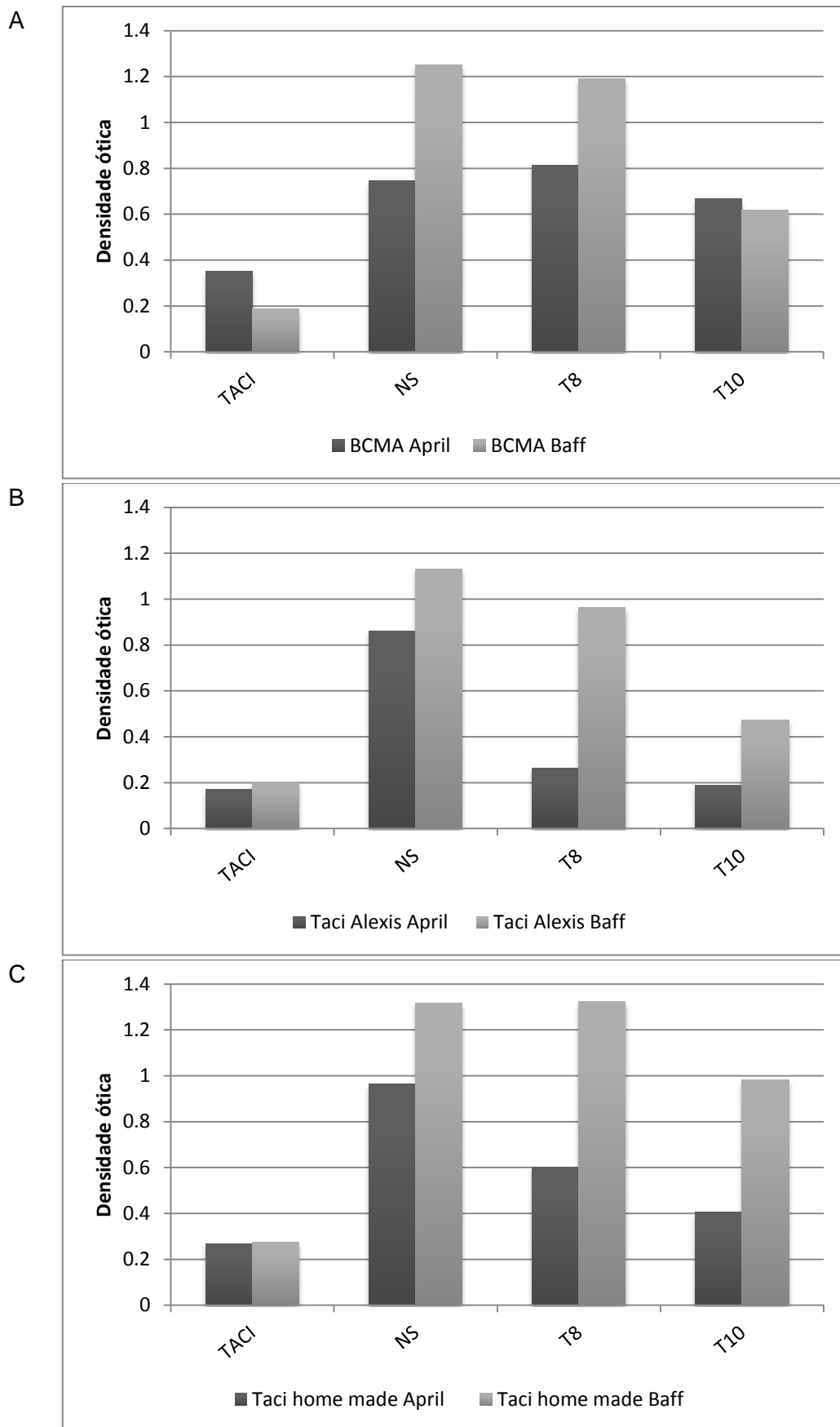


Figura 41 – Elisa competitivo confirmatório aplicando T8 e T10 sob diferentes *coatings*. A) BCMA, B)TACI Alexis, C)TACI *home made*.

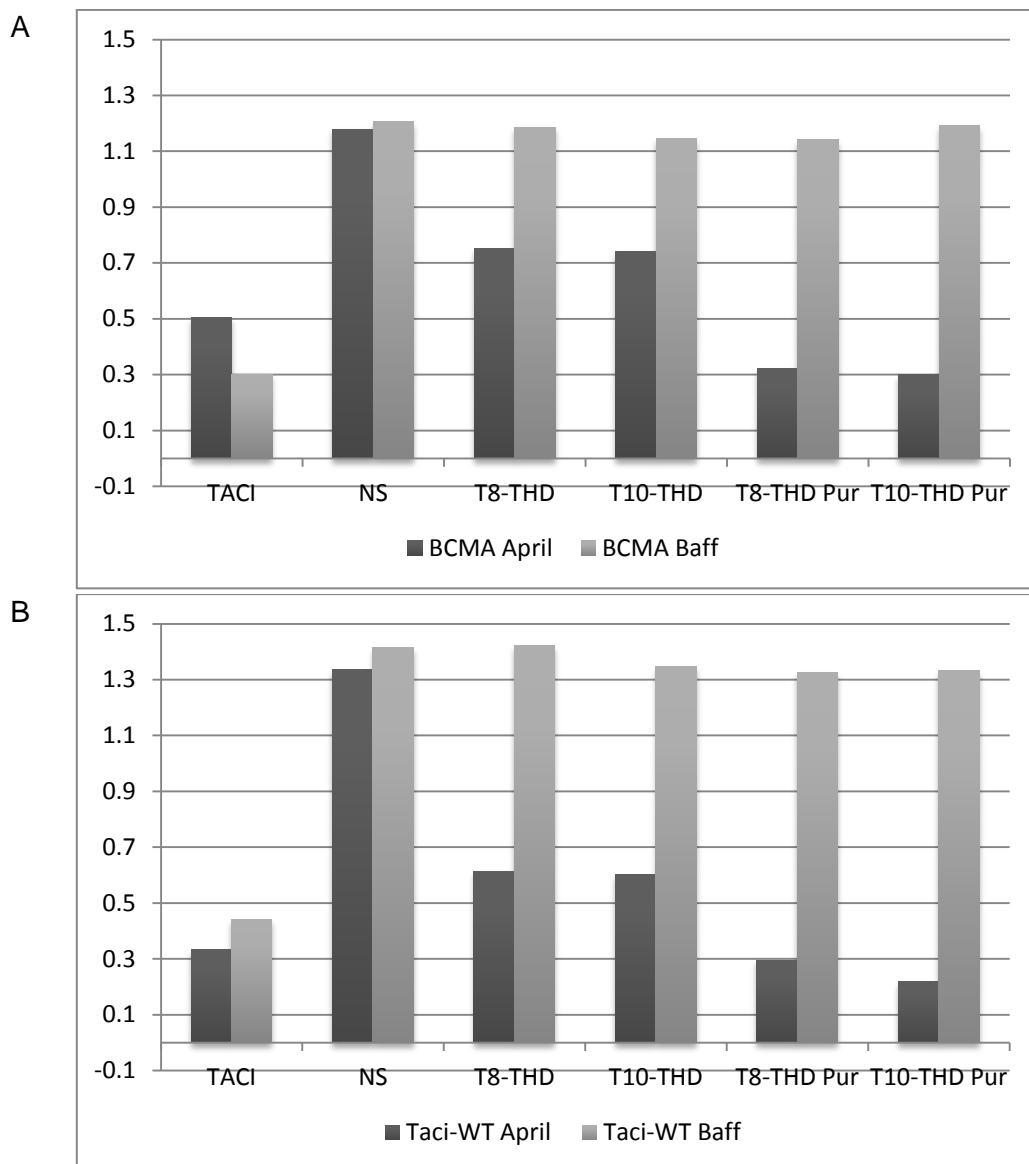


Figura 42 – Elisa competitivo mostrando o efeito inibidor de T8 e T10 sem o domínio TMD. A terceira e quarta colunas mostram o efeito de T8 e T10 aplicado com a presença de meio de cultura e soro fetal bovino, enquanto as duas últimas colunas mostram o efeito dos peptídeos purificados em coluna de afinidade por Ig.

Os resultados confirmam que a presença de TMD leva a uma melhora na interação com APRIL e BAFF simultaneamente, como descrito anteriormente (figura 40 e figura 41), porém o efeito inibidor buscado não foi obtido com os peptídeos contendo esse domínio. A diferença notada quando utilizado TACI comercial e TACI expresso clonado no laboratório pode ser devido à presença de outros fatores secretados

presentes no sobrenadante (soro fetal bovino, antibióticos, aminoácidos utilizados como suplemento do meio de cultura, dentre outros).

As simulações foram conduzidas sem esse domínio, então as predições propostas pelo cálculo de energia livre e pela dinâmica molecular não levaram em consideração a interação dessa região. Para esclarecer o comportamento observado nos peptídeos contendo o domínio TMD, foram clonados novamente T8 e T10 sem esse domínio.

Foi possível notar que as DO de T8 e T10 apresentaram praticamente os mesmos valores (1,42 e 1,34, respectivamente) que o controle negativo (1,41). O leve aumento da DO de APRIL, visualizado em T8 e T10 não pareceu comprometer a seletividade desses peptídeos, que claramente apresentaram um efeito específico em APRIL. Ao medir a DO para T8 e T10 purificados e concentrados, a redução para APRIL foi ainda mais visível, ao contrário do observado em BAFF, que manteve inalterada a DO (figura 42).

5. Conclusões e perspectivas

Nesse trabalho apresentamos uma alternativa à utilização do *alanine scanning* computacional, visando ao entendimento dos mecanismos de seletividade entre TACI e APRIL/BAFF, que permitiu elucidar interações intermoleculares cruciais para a interação das proteínas envolvidas, além de sugerir uma plataforma peptídica construída com base nas informações coletadas através das simulações computacionais.

Devido à grande complexidade e à ampla abrangência da funcionalidade destas moléculas, um estudo exaustivo e detalhado foi necessário, visando à concretização de novos antagonistas com propriedades terapêuticas através do planejamento racional de fármacos.

Os coeficientes padrão de LIE, sugeridos por Almlof (Hansson, Marelius *et al.*, 1998), parecem ser adequados para calcular a variação de energia livre de BAFF complexada a TACI, confirmando parcialmente os resultados de *alanine scanning* obtidos pela aplicação de outras técnicas experimentais e computacionais. Porém, os mesmos coeficientes utilizados ($\beta=0,37$ para Glu e Asp, $0,43$ para os demais aminoácidos; $\alpha=0,181$), não foram capazes de indicar com exatidão a localização dos *hot spots* de TACI quando em associação com APRIL.

A correção sugerida para o $\Delta\Delta G$ dos resíduos carregados ($\Delta\Delta G=1.35|\text{pH}-\text{Pka}|$), força a adoção da forma neutra dos aminoácidos na simulação com o programa Q, tanto do valor do coeficiente β , quanto da forma não protonada de ASP, GLU, ARG e LYS do campo de força Gromos96.

Os *hot spots* de APRIL e BAFF, apontados por outras técnicas, mostraram um padrão similar, com algumas posições coincidentes, enquanto os *hot spots*

apontados por LIE são distintos das demais técnicas. Essa observação se dá em função da adequação dos coeficientes de calibração ao sistema BAFF-TACI.

As médias dos valores das energias de *van der Waals* e eletrostática, quando calculados para a alanina substituinte dos resíduos selvagens durante o *alanine scanning*, são estáveis. A inserção da alanina como forma de testar a influência energética se mostrou apropriada, dada sua baixa interferência com o sistema. A associação dessa abordagem junto ao cálculo de energia livre por LIE necessita, entretanto, de refinamento principalmente em relação aos coeficientes de calibração empírica.

Os métodos de cálculo de energia livre têm sido aprimorados nos últimos anos, porém a controvérsia dos valores de afinidade experimental publicados para o sistema APRIL-TACI, até o momento, dificulta a aplicação de coeficientes de calibração diferentes dos valores padrão. A aplicação dessa técnica tem uma maior confiabilidade quando se dispõe de dados de afinidade experimentais. Porém, coeficientes de sistemas similares podem ser utilizados como uma forma de aproximação ou de observação de tendências seguidas pelo sistema. A utilização dos coeficientes padrão pode indicar essas tendências, embora, para a estimativa precisa da variação de energia livre, outros valores de α , β e γ sejam necessários.

Uma alternativa viável que pretendemos iniciar em breve será a análise do perfil energético de TACI complexado a APRIL e BAFF pela aplicação do método de perturbação de energia livre, para fins de comprovação dos valores de $\Delta\Delta G$ obtidos por LIE.

O número de pontes salinas entre T0 e APRIL é maior que para o mesmo peptídeo e BAFF. De acordo com observações feitas em estudos prévios, as pontes

salinas exercem influência direta no reconhecimento proteína-proteína.(Xu, Tsai *et al.*, 1997) Essa observação é determinante para a comprovação da seletividade de TACI por APRIL e pode ser explorada em futuros candidatos a inibidores. As mutações propostas nos peptídeos planejados nesse trabalho pareceram ter papel determinante no aumento da interação entre APRIL e esses possíveis antagonistas.

A série de peptídeos planejados funciona inibindo a interação de APRIL com seus principais receptores *in vitro*. A associação das características físicas e estruturais observadas na dinâmica, tais como as pontes de hidrogênio mapeadas, a existência de um número maior de pontes salinas para APRIL e o menor RMSD, apontando uma maior estabilidade, mostraram ter relação com aumento da interação dos peptídeos e APRIL.

A inserção do domínio THD faz com que a atividade dos peptídeos mutados seja equivalente, bloqueando APRIL e BAFF de maneira similar. Ao ser removido o domínio, os peptídeos ligados diretamente a Ig parecem ter ação seletiva para APRIL, conforme indicado pelos resultados do ELISA. A não disponibilidade de técnicas capazes de detectar o peptídeo sem estar acoplado à Ig impediu que outros experimentos fossem feitos visando à comprovação dessa observação.

O bloqueio parece se dar diferencialmente quando comparados TACI e BCMA como *coating*. O bloqueio foi mais específico em TACI do que em BCMA, levantando a hipótese de que BCMA poderia ter um sítio de interação distinto do de TACI. Os antagonistas mostraram uma maior eficácia ao inibir a ligação de APRIL com TACI comercial.

Experimentos adicionais com TACI e APRIL humanos, comerciais ou produzidos e purificados no laboratório, seriam necessários para um melhor

entendimento da atividade dos nossos antagonistas nas proteínas humanas. Adicionalmente, outra técnica, como ressonância plasmônica, poderá ser utilizada para a confirmação da participação dos resíduos apontados nesse trabalho, no reconhecimento de APRIL e auxiliando no desenho de outros peptídeos. Pretendemos também realizar ensaios de dicroísmo circular para assegurar a estrutura secundária dos peptídeos antes de humanizar os peptídeos e prosseguir com testes subsequentes.

O manuscrito do artigo submetido ao *Journal of Molecular Modeling* encontra-se no anexo III. Esse artigo será complementado com os cálculos de Perturbação da Energia Livre e resubmetido.

6. Referências Bibliográficas

AGGARWAL, B. B. et al. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, n. 4, p. 327-41, Dec 2002.

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer simulation of liquids**. Oxford [England], New York: Clarendon Press; Oxford University Press, 1987. xix, 385 p.

ALLINGER, N. L. Calculation of Molecular Structure and Energy by Force-Field Methods. In: GOLD, V. e BETHELL, D. (Ed.). **Advances in Physical Organic Chemistry**: Academic Press, v. Volume 13, 1976. p.1-82.

AQVIST, J.; MARELIUS, J. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 4, n. 8, p. 613-26, Dec 2001.

AQVIST, J.; MEDINA, C.; SAMUELSSON, J. E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. **Protein Eng**, v. 7, n. 3, p. 385-91, Mar 1994.

ARCHAKOV, A. I. et al. Protein-protein interactions as a target for drugs in proteomics. **Proteomics**, v. 3, n. 4, p. 380-91, Apr 2003.

ARKIN, M. R. et al. Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1603-8, Feb 18 2003.

ARKIN, M. R.; WELLS, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 4, p. 301-17, Apr 2004.

BELNOUE, E. et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2755-64, Mar 1 2008.

BERENDSEN, H. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, 1984.

BERENDSEN, H. et al. Intermolecular Forces. In: B, P. (Ed.): Reidel: Dordrecht, 1981. p.331.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 235-42, Jan 1 2000.

BODMER, J. L.; SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. **Trends Biochem Sci**, v. 27, n. 1, p. 19-26, Jan 2002.

BOGAN, A. A.; THORN, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. **J Mol Biol**, v. 280, n. 1, p. 1-9, Jul 3 1998.

BÖHM, H.-J.; SCHNEIDER, G. **Protein-ligand interactions from molecular recognition to drug design**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. xx, 242 p.

BOSEN, C. et al. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. **J Biol Chem**, v. 281, n. 20, p. 13964-71, May 19 2006.

BOSEN, C.; SCHNEIDER, P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. **Semin Immunol**, v. 18, n. 5, p. 263-75, Oct 2006.

BRÄNDÉN, C.-I.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York: Garland Pub., 1991. xv, 302 p.

BRANDSDAL, B. O.; AQVIST, J.; SMALAS, A. O. Computational analysis of binding of P1 variants to trypsin. **Protein Sci**, v. 10, n. 8, p. 1584-95, Aug 2001.

BRANDT, S. M. et al. Secreted Bacterial Effectors and Host-Produced Eiger/TNF Drive Death in a Salmonella-Infected Fruit Fly. **PLoS Biol**, v. 2, n. 12, p. e418, Dec 2004.

BROOKS-III, C. L.; KARPLUS, M.; PETTITT, M. Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics. In: (Ed.). **Advances in Chemical Physics**: John Wiley & Sons, Inc., 1988. p.225-231.

BROOKS, B. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comput. Chem.**, v. 4, n. 2, p. 187-217, 1983.

CARLSSON, J.; BOUKHARTA, L.; AQVIST, J. Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase. **J Med Chem**, v. 51, n. 9, p. 2648-56, May 8 2008.

CLACKSON, T.; WELLS, J. A. A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. **Science**, v. 267, n. 5196, p. 383-6, Jan 20 1995.

DAURA, X.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. Parametrization of aliphatic CH_n united atoms of GROMOS96 force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 535-547, 1998.

DAY, E. S. et al. Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. **Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1919-31, Feb 15 2005.

DELANO, W. L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. **Curr Opin Struct Biol**, v. 12, n. 1, p. 14-20, Feb 2002.

DILLON, S. R. et al. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 235-46, Mar 2006.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577-8593, 1995.

ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Curr Protoc Bioinformatics**, v. Chapter 5, p. Unit 5 6, Oct 2006.

FERSHT, A. **Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding**. W.H. Freeman, 1999.

FERSHT, A. R. et al. Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. **Nature**, v. 314, n. 6008, p. 235-8, Mar 21-27 1985.

FORMAN-KAY, J. D. The 'dynamics' in the thermodynamics of binding. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 12, p. 1086-7, Dec 1999.

FOURNEL, S. et al. C3-symmetric peptide scaffolds are functional mimetics of trimeric CD40L. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 7, p. 377-82, Dec 2005.

GATTO, B. Atacicept, a homodimeric fusion protein for the potential treatment of diseases triggered by plasma cells. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 9, n. 11, p. 1216-27, Nov 2008.

GAVIN, A. L. et al. DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 38220-8, Oct 3 2003.

GILSON, M. K. et al. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review. **Biophys J**, v. 72, n. 3, p. 1047-69, Mar 1997.

GORDON, N. C. et al. BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. **Biochemistry**, v. 42, n. 20, p. 5977-83, May 27 2003.

GOUDA, H. et al. Free energy calculations for theophylline binding to an RNA aptamer: Comparison of MM-PBSA and thermodynamic integration methods. **Biopolymers**, v. 68, n. 1, p. 16-34, Jan 2003.

GREER, J. et al. Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. **J Med Chem**, v. 37, n. 8, p. 1035-54, Apr 15 1994.

GROSS, J. A. et al. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. **Immunity**, v. 15, n. 2, p. 289-302, Aug 2001.

GUEROIS, R.; NIELSEN, J. E.; SERRANO, L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. **J Mol Biol**, v. 320, n. 2, p. 369-87, Jul 5 2002.

HAHNE, M. et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. **J Exp Med**, v. 188, n. 6, p. 1185-90, Sep 21 1998.

HANCOCK, C. N. et al. Mitogen activated protein (MAP) kinases: development of ATP and non-ATP dependent inhibitors. **Med Chem**, v. 2, n. 2, p. 213-22, Mar 2006.

HANSSON, T.; MARELIUS, J.; AQVIST, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **J Comput Aided Mol Des**, v. 12, n. 1, p. 27-35, Jan 1998.

HATZOGLOU, A. et al. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. **J Immunol**, v. 165, n. 3, p. 1322-30, Aug 1 2000.

HENDRIKS, J. et al. Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 6, p. 637-48, Jun 2005.

HENDSCH, Z. S.; TIDOR, B. Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis. **Protein Sci**, v. 3, n. 2, p. 211-26, Feb 1994.

HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 22, p. 10915-9, Nov 15 1992.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.

HODGES, R. S.; MERRIFIELD, R. B. Synthetic study of the effect of tyrosine at position 120 of ribonuclease. **Int J Pept Protein Res**, v. 6, n. 6, p. 397-405, 1974.

HU, Z. et al. Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. **Proteins**, v. 39, n. 4, p. 331-42, Jun 1 2000.

HUBBARD, S. J.; CAMPBELL, S. F.; THORNTON, J. M. Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. **J Mol Biol**, v. 220, n. 2, p. 507-30, Jul 20 1991.

HUO, S.; MASSOVA, I.; KOLLMAN, P. A. Computational alanine scanning of the 1:1 human growth hormone-receptor complex. **J Comput Chem**, v. 23, n. 1, p. 15-27, Jan 15 2002.

HYMOWITZ, S. G. et al. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. **Mol Cell**, v. 4, n. 4, p. 563-71, Oct 1999.

HYMOWITZ, S. G. et al. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. **J Biol Chem**, v. 280, n. 8, p. 7218-27, Feb 25 2005.

INGOLD, K. et al. Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. **J Exp Med**, v. 201, n. 9, p. 1375-83, May 2 2005.

JARVIS, B.; FAULDS, D. Etanercept: a review of its use in rheumatoid arthritis. **Drugs**, v. 57, n. 6, p. 945-66, Jun 1999.

JORDAN, I. K. et al. A universal trend of amino acid gain and loss in protein evolution. **Nature**, v. 433, n. 7026, p. 633-8, Feb 10 2005.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577-637, Dec 1983.

KESKIN, O.; MA, B.; NUSSINOV, R. Hot regions in protein--protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. **J Mol Biol**, v. 345, n. 5, p. 1281-94, Feb 4 2005.

KHARE, S. D. et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 3370-5, Mar 28 2000.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Web Server issue, p. W526-31, Jul 1 2004.

KIM, H. M. et al. Crystal structure of the BAFF-BAFF-R complex and its implications for receptor activation. **Nat Struct Biol**, v. 10, n. 5, p. 342-8, May 2003.

KIMBERLEY, F. C.; HAHNE, M.; MEDEMA, J. P. "APRIL hath put a spring of youth in everything": Relevance of APRIL for survival. **J Cell Physiol**, v. 218, n. 1, p. 1-8, Jan 2009.

KIMBERLEY, F. C.; MEDEMA, J. P.; HAHNE, M. APRIL in B-cell malignancies and autoimmunity. **Results Probl Cell Differ**, v. 49, p. 161-82, 2009.

KIMBERLEY, F. C. et al. The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. **FASEB J**, Jan 13 2009a.

_____. The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. **FASEB J**, v. 23, n. 5, p. 1584-95, May 2009b.

KOLFSCHOTEN, G. M. et al. TWE-PRIL; a fusion protein of TWEAK and APRIL. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 8, p. 1427-32, Oct 15 2003.

KORTEMME, T.; BAKER, D. A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 22, p. 14116-21, Oct 29 2002.

KORTEMME, T.; KIM, D. E.; BAKER, D. Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. **Sci STKE**, v. 2004, n. 219, p. pl2, Feb 10 2004.

KORTEMME, T.; MOROZOV, A. V.; BAKER, D. An orientation-dependent hydrogen bonding potential improves prediction of specificity and structure for proteins and protein-protein complexes. **J Mol Biol**, v. 326, n. 4, p. 1239-59, Feb 28 2003.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J Mol Biol**, v. 372, n. 3, p. 774-97, Sep 21 2007.

KURZROCK, R. et al. Pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biological activity of recombinant gamma-interferon in cancer patients. **Cancer Res**, v. 45, n. 6, p. 2866-72, Jun 1985.

LAMPSON, M. A.; KAPOOR, T. M. Unraveling cell division mechanisms with small-molecule inhibitors. **Nat Chem Biol**, v. 2, n. 1, p. 19-27, Jan 2006.

LAZARIDIS, T.; KARPLUS, M. Effective energy function for proteins in solution. **Proteins**, v. 35, n. 2, p. 133-52, May 1 1999.

LEACH, A. **Molecular Modelling: Principles and Applications (2nd Edition)**. Prentice Hall, 2001.

LEE, B.; RICHARDS, F. M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. **J Mol Biol**, v. 55, n. 3, p. 379-400, Feb 14 1971.

LEINONEN, R. et al. UniProt archive. **Bioinformatics**, v. 20, n. 17, p. 3236-7, Nov 22 2004.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306-317, 2001.

LISE, S. et al. Prediction of hot spot residues at protein-protein interfaces by combining machine learning and energy-based methods. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 365, 2009.

LIU, Y. et al. Ligand-receptor binding revealed by the TNF family member TALL-1. **Nature**, v. 423, n. 6935, p. 49-56, May 1 2003.

LJUNGBERG, K. B. et al. Computational modelling of inhibitor binding to human thrombin. **Eur J Pharm Sci**, v. 12, n. 4, p. 441-6, Feb 2001.

LO CONTE, L.; CHOTHIA, C.; JANIN, J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. **J Mol Biol**, v. 285, n. 5, p. 2177-98, Feb 5 1999.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, Feb 23 2001.

MACKAY, F.; LEUNG, H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. **Semin Immunol**, v. 18, n. 5, p. 284-9, Oct 2006.

MARELIUS, J. et al. Q: a molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. **J Mol Graph Model**, v. 16, n. 4-6, p. 213-25, 261, Aug-Dec 1998.

MARELIUS, J. et al. Q: a molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 16, n. 4-6, p. 213-225, 1998.

MARTI-RENO, M. A. et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 29, p. 291-325, 2000.

MASSOVA, I.; KOLLMAN, P. A. Computational Alanine Scanning To Probe Protein-Protein Interactions: A Novel Approach To Evaluate Binding Free Energies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 36, p. 8133-8143, 1999.

MOREAUX, J. et al. APRIL and TACI interact with syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. **Eur J Haematol**, v. 83, n. 2, p. 119-29, Aug 2009.

MOREIRA, I. S.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Computational alanine scanning mutagenesis--an improved methodological approach. **J Comput Chem**, v. 28, n. 3, p. 644-54, Feb 2007.

MORRISON, K. L.; WEISS, G. A. Combinatorial alanine-scanning. **Curr Opin Chem Biol**, v. 5, n. 3, p. 302-7, Jun 2001.

NAVARRA, S. V. et al. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet**, v. 377, n. 9767, p. 721-31, Feb 26 2011.

OREN, D. A. et al. Structural basis of BlyS receptor recognition. **Nat Struct Biol**, v. 9, n. 4, p. 288-92, Apr 2002.

PATEL, D. R. et al. Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. **J Biol Chem**, v. 279, n. 16, p. 16727-35, Apr 16 2004.

PELLETIER, M. et al. Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF. **J Biol Chem**, v. 278, n. 35, p. 33127-33, Aug 29 2003.

PLANELLES, L. et al. APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 399-408, Oct 2004.

PLANELLES, L. et al. APRIL but not BlyS serum levels are increased in chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of APRIL for survival. **Haematologica**, v. 92, n. 9, p. 1284-5, Sep 2007.

PLANELLES, L. et al. The expanding role of APRIL in cancer and immunity. **Curr Mol Med**, v. 8, n. 8, p. 829-44, Dec 2008.

PONS, J.; RAJPAL, A.; KIRSCH, J. F. Energetic analysis of an antigen/antibody interface: alanine scanning mutagenesis and double mutant cycles on the HyHEL-10/lysozyme interaction. **Protein Sci**, v. 8, n. 5, p. 958-68, May 1999.

PRADET-BALADE, B. et al. An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. **EMBO J**, v. 21, n. 21, p. 5711-20, Nov 1 2002.

QASIM, M. A. et al. Ionizable P1 Residues in Serine Proteinase Inhibitors Undergo Large pK Shifts on Complex Formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 46, p. 27419-27422, November 17, 1995 1995.

REYES, C. M.; KOLLMAN, P. A. Structure and thermodynamics of RNA-protein binding: using molecular dynamics and free energy analyses to calculate the free energies of binding and conformational change. **J Mol Biol**, v. 297, n. 5, p. 1145-58, Apr 14 2000.

RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends Genet**, v. 16, n. 6, p. 276-7, Jun 2000.

ROOSNEK, E. et al. Tumors that look for their springtime in APRIL. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 72, n. 2, p. 91-7, Nov 2009.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol**, v. 234, n. 3, p. 779-815, Dec 5 1993.

SCHLICK, T. **Molecular modeling and simulation : an interdisciplinary guide**. New York: Springer, 2010.

SCHNEIDER, P. et al. Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. **J Exp Med**, v. 194, n. 11, p. 1691-7, Dec 3 2001.

SCHRODINGER, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1** 2010.

SCHYMKOWITZ, J. et al. The FoldX web server: an online force field. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. Web Server issue, p. W382-8, Jul 1 2005.

SHARP, K. A. Calculation of HyHel10-lysozyme binding free energy changes: effect of ten point mutations. **Proteins**, v. 33, n. 1, p. 39-48, Oct 1 1998.

SHEU, S. Y. et al. Energetics of hydrogen bonds in peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 22, p. 12683-7, Oct 28 2003.

SPYRAKIS, F. et al. Protein Flexibility and Ligand Recognition: Challenges for Molecular Modeling. **Curr Top Med Chem**, Nov 12 2010.

SRINIVASAN, J. et al. Continuum solvent studies of the stability of RNA hairpin loops and helices. **J Biomol Struct Dyn**, v. 16, n. 3, p. 671-82, Dec 1998.

STEINMAN, L. Immune therapy for autoimmune diseases. **Science**, v. 305, n. 5681, p. 212-6, Jul 9 2004.

SUN, J. et al. A novel BlyS antagonist peptide designed based on the 3-D complex structure of BCMA and BlyS. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 346, n. 4, p. 1158-62, Aug 11 2006.

TANAKA, S. et al. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. **Immunol Rev**, v. 208, p. 30-49, Dec 2005.

THORN, K. S.; BOGAN, A. A. ASEdb: a database of alanine mutations and their effects on the free energy of binding in protein interactions. **Bioinformatics**, v. 17, n. 3, p. 284-5, Mar 2001.

TONG, A. H. et al. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. **Science**, v. 295, n. 5553, p. 321-4, Jan 11 2002.

TOOGOOD, P. L. Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. **J Med Chem**, v. 45, n. 8, p. 1543-58, Apr 11 2002.

TUNCBAG, N.; GURSOY, A.; KESKIN, O. Identification of computational hot spots in protein interfaces: combining solvent accessibility and inter-residue potentials improves the accuracy. **Bioinformatics**, v. 25, n. 12, p. 1513-20, Jun 15 2009.

TUNCBAG, N.; GURSOY, A.; KESKIN, O. Identification of computational hot spots in protein interfaces: combining solvent accessibility and inter-residue potentials improves the accuracy. **Bioinformatics**, v. 25, n. 12, p. 1513-1520, June 15, 2009 2009.

TUNCBAG, N.; KESKIN, O.; GURSOY, A. HotPoint: hot spot prediction server for protein interfaces. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Web Server issue, p. W402-6, Jul 2010.

WALLWEBER, H. J. A. et al. The Crystal Structure of A Proliferation-inducing Ligand, APRIL. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, n. 2, p. 283-290, 2004.

WALSH, C. T. Natural insights for chemical biologists. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 3, p. 122-4, Aug 2005.

WANG, J. et al. Use of MM-PBSA in Reproducing the Binding Free Energies to HIV-1 RT of TIBO Derivatives and Predicting the Binding Mode to HIV-1 RT of Efavirenz by Docking and MM-PBSA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 22, p. 5221-5230, 2001.

WANG, W. et al. Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 30, p. 211-43, 2001.

WANG, W.; KOLLMAN, P. A. Free energy calculations on dimer stability of the HIV protease using molecular dynamics and a continuum solvent model. **J Mol Biol**, v. 303, n. 4, p. 567-82, Nov 3 2000.

WANG, W.; WANG, J.; KOLLMAN, P. A. What determines the van der Waals coefficient beta in the LIE (linear interaction energy) method to estimate binding free energies using molecular dynamics simulations? **Proteins**, v. 34, n. 3, p. 395-402, Feb 15 1999.

WEISS, G. A. et al. Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 8950-4, Aug 1 2000.

XIA, X. Z. et al. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. **J Exp Med**, v. 192, n. 1, p. 137-43, Jul 3 2000.

XU, D.; TSAI, C. J.; NUSSINOV, R. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. **Protein Eng**, v. 10, n. 9, p. 999-1012, Sep 1997.

YU, G. et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. **Nat Immunol**, v. 1, n. 3, p. 252-6, Sep 2000.

ZHANG, G. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 2, p. 154-160, 2004.

ZHOU, L.; SIEGELBAUM, S. A. Pathway and Endpoint Free Energy Calculations for Cyclic Nucleotide Binding to HCN Channels. **Biophysical journal**, v. 94, n. 12, p. L90-L92, 2008.

ZHURAVLEV, P. I.; PAPOIAN, G. A. Protein functional landscapes, dynamics, allostery: a tortuous path towards a universal theoretical framework. **Q Rev Biophys**, v. 43, n. 3, p. 295-332, Aug 2010.

ZOETE, V.; MICHELIN, O. Comparison between computational alanine scanning and per-residue binding free energy decomposition for protein-protein association using MM-GBSA: application to the TCR-p-MHC complex. **Proteins**, v. 67, n. 4, p. 1026-47, Jun 1 2007.

7. Anexo I

7.1. Lista de primers utilizados na PCR.

Hahne304: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
Hahne305: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG
Hahne403: TCCTGGACGACTGCATCAGCTGTG
Hahne404: CACAGCTGATGCAGTCGTCCAGG
Hahne405: TCCTGGAGGACTGCATCAGCTGTG
Hahne406: CACAGCTGATGCAGTCCTCCAGG
HAHNE409: TTCACCGCTGTGCGGGGCTGCCGCAAGGAGCTACTC
HAHNE410: TTCACCGCTGTGCGGGGCTGCCGCAAGGAGCAATTC
HAHNE411: ATGGCTATCATCTACCTCATCCTCCTGTTACCGCTGTGCGGGGC
HAHNE412: CAATGTGCATACTTCTGTGAGAAAACACACATGC
HAHNE413: GCATGTGTGAGTTTTCTCACAGAAGTATGCACATTG

7.2. Protocolos do PCR para clonagem de T8, T9, T10 e T11

T8

PCR 1

PCR com os primers Hahne304/Hahne406

100ng (=1ul) DNA TACI (ES23)
1ul primer Hahne304 (20mM)
1ul primer Hahne406 (20mM)
0.5ml dNTPs (10mM)
10µl 5x buffer (+Mg²⁺)
1.5µl DMSO
0.5µl Phusion Taq
Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos at 58°C

PCR 2

PCR com os primers Hahne305/Hahne405

100ng DNA ES23
1ul primer Hahne305 (10mM)
1ul primer Hahne405 (10mM)
0.5ml dNTPs (10mM) PCR
10µl 5x buffer (+Mg²⁺)
1.5µl DMSO
0.5µl Phusion Taq
Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos a 58°C

purificar o produto do PCR em coluna

PCR 3

PCR com os primers Hahne304/Hahne305

5ul PCR1
5ul PCR2
1ul primer Hahne304 (10mM)
1ul primer Hahne305 (10mM)

0.5ul dNTPs (10mM)
10µl 5x buffer (+Mg2+)
1.5µl DMSO
0.5µl Phusion Taq
Completar com água até o total de 50µl

24 ciclos a 58°C

Purificar o produto do PCR em gel de agarose

1,5ul PCR3 product
0,5ul pDONOR
0,5ul BPmix

REAÇÃO BP

37.5 ng of PCR product	(-1,5 ul)
37.5 ng de pDNOR221 Mop32	0,5 ul
Mix enzyme/buffer	0,5 ul
H2O mq, up to	2,5 ul

REAÇÃO LR

Shuttle vector with insert 50 ng	(-1,5 ul)
Dest (MOP 59) (50ng)	0,5 ul
Mix enzyme LR/buffer	0,5 ul
H2O mq, up to	2,5 ul

T9

PCR 1

PCR com primers Hahne304/Hahne404

100ng DNA ES23
1ul primer Hahne304 (10mM)
1ul primer Hahne404 (10mM)
0.5ml dNTPs (10mM)
10µl 5x buffer (+Mg2+)
1.5µl DMSO
0.5µl Phusion Taq
Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos a 58°C

PCR 2

PCR com primers Hahne305/Hahne403

100ng DNA MOP 71
1ul primer Hahne305 (10mM)
1ul primer Hahne403 (10mM)
0.5ml dNTPs (10mM) PCR
10µl 5x buffer (+Mg2+)
1.5µl DMSO
0.5µl Phusion Taq
Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos a 58°C

purificar o produto do PCR em coluna

PCR 3

PCR com primers Hahne304/Hahne305

- 5ul PCR1
- 5ul PCR2
- 1ul primer Hahne304 (10mM)
- 1ul primer Hahne305 (10mM)
- 0.5ul dNTPs (10mM)
- 10µl 5x buffer (+Mg2+)
- 1.5µl DMSO
- 0.5µl Phusion Taq
- Completar com água até o total de 50µl

24 ciclos a 58°C

Purificar o produto do PCR em gel de agarose

T10

PCR 1

PCR com os primers Hahne304/Hahne404

- 100ng DNA MOP 135
- 1ul primer Hahne304 (10mM)
- 1ul primer Hahne404 (10mM)
- 0.5ml dNTPs (10mM)
- 10µl 5x buffer (+Mg2+)
- 1.5µl DMSO
- 0.5µl Phusion Taq
- Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos a 58°C

PCR 2

PCR com os primers Hahne305/Hahne403

- 100ng DNA MOP 135
- 1ul primer Hahne305 (10mM)
- 1ul primer Hahne403 (10mM)
- 0.5ml dNTPs (10mM) PCR
- 10µl 5x buffer (+Mg2+)
- 1.5µl DMSO
- 0.5µl Phusion Taq
- Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos a 58°C

purificar o produto do PCR em coluna

PCR 3

PCR com os primers Hahne304/Hahne305

- 5ul PCR1
- 5ul PCR2
- 1ul primer Hahne304 (10mM)
- 1ul primer Hahne305 (10mM)
- 0.5ul dNTPs (10mM)
- 10µl 5x buffer (+Mg²⁺)
- 1.5µl DMSO
- 0.5µl Phusion Taq
- Completar com água até o total de 50µl

24 ciclos a 58°C

Purificar o produto do PCR em gel de agarose

T11

PCR 1

PCR com os primers Hahne304/Hahne404

- 100ng DNA MOP 136
- 1ul primer Hahne304 (10mM)
- 1ul primer Hahne404 (10mM)
- 0.5ml dNTPs (10mM)
- 10µl 5x buffer (+Mg²⁺)
- 1.5µl DMSO
- 0.5µl Phusion Taq
- Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos a 58°C

PCR 2

PCR com os primers Hahne305/Hahne403

- 100ng DNA MOP 136
- 1ul primer Hahne305 (10mM)
- 1ul primer Hahne403 (10mM)
- 0.5ml dNTPs (10mM) PCR
- 10µl 5x buffer (+Mg²⁺)
- 1.5µl DMSO
- 0.5µl Phusion Taq
- Completar com água até o total de 50µl

10 ciclos a 58°C

purificar o produto do PCR em coluna

PCR 3

PCR com os primers Hahne304/Hahne305

- 5ul PCR1
- 5ul PCR2
- 1ul primer Hahne304 (10mM)

1ul primer Hahne305 (10mM)
0.5ul dNTPs (10mM)
10ul 5x buffer (+Mg2+)
1.5ul DMSO
0.5ul Phusion Taq
Completar com água até o total de 50ul
24 ciclos a 58°C

Purificar o produto do PCR em gel de agarose

T8 sem o domínio TMD

PCR 1

PCR com os primers Hahne411/Hahne413

100ng DNA MOP190
0,5ul primer Hahne411 (20mM)
0,5ul primer Hahne413 (20mM)
0,25ul dNTPs (10mM)
5ul 5x buffer (+Mg2+)
0.75ul DMSO
0.25ul Phusion Taq
Completar com água até o total de 50ul

24 ciclos a 68°C

Purificar o produto do PCR em gel de agarose

PCR 2

PCR com os primers Hahne305/Hahne412

100ng DNA MOP190
0,5ul primer Hahne412 (10mM)
0,5ul primer Hahne305 (10mM)
0,25ul dNTPs (10mM) PCR
5ul 5x buffer (+Mg2+)
0.75ul DMSO
0.25ul Phusion Taq
Completar com água até o total de 50ul

10 ciclos a 68°C

purificar o produto do PCR em gel de agarose

PCR 3

PCR com os primers Hahne304/Hahne305

10ul PCR2
0,5ul primer Hahne304 (10mM)
0,5ul primer Hahne305 (10mM)
0,25ul dNTPs (10mM)
5ul 5x buffer (+Mg2+)
0.75ul DMSO
0.25ul Phusion Taq

Completar com água até o total de 50µl

24 ciclos a 68°C

purificar o produto do PCR em coluna

1,5ul PCR3 product

REAÇÃO BP

37.5 ng of PCR product	(-1,5 ul)
37.5 ng de pDNOR221	0,5 ul
Mix enzyme/buffer	0,5 ul
H2O mq, up to	2,5 ul

REAÇÃO LR

Shuttle vector with insert 50 ng	(-1,5 ul)
Dest (MOP 59) (50ng)	0,5 ul
Mix enzyme LR/buffer	0,5 ul
H2O mq, up to	2,5 ul

7.3. Protocolo do ELISA

1 – Adicionar 100 µl por poço de 20 ng/ml de BCMA (Peprotech), diluído em tampão de sensibilização. Incubar *overnight* a 4°C. (Tampão de sensibilização : 11.8 g Na₂HPO₄, 16,1 g NaH₂PO₄ para 1 litro), pH 6,5.

2- Aspirar e lavar 3 vezes.

Tampão de lavagem: PBS-Tween (80 g NaCl, 11,6 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 2 g KCl para 1 litro, pH 6,5), Tween-20 0,05%

3- Bloquear cada poço com 200µl de diluente de ensaio. Incubar por 1 h.

Diluente de ensaio: PBS (80 g NaCl, 11,6 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 2 g KCl para 1 litro, pH 6,5), 10% soro fetal bovino inativado

4- Aspirar e lavar três vezes.

5- Adicionar 100 µl da amostra (0,75 µl APRIL-Flag ou BAFF-Flag (6,25 ng/ml) por poço, diluído em DMEM. Incubar por 2 horas a temperatura ambiente

Preparo das amostras de sobrenadante:

	+ 100ul de sobrenadante					
0.75ul FLAG-APRIL	T8 SN	T9 SN	T10 SN	T11 SN	TACI	DMEM
0.75ul FLAG-BAFF						

Preparar 100 µl de cada sobrenadante, adicionar 1,5 ul de APRIL-Flag ou BAFF-Flag, misturar, incubar por 15 minutos em banho de gelo e adicionar nos poços.

6- Aspirar e lavar cinco vezes

7- Adicionar 100 µl de anticorpo anti-Flag (1 µg/ml) em cada poço, diluído em diluente de ensaio. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente

8- Aspirar e lavar sete vezes

9- Adicionar 100 µl de IgG anti camundongo acoplada a peroxidase (1:1000), em cada poço, diluído em diluente de ensaio. Incubar por 30 minutos-1 hora a temperatura ambiente, no escuro.

10- Aspirar e lavar cinco vezes.

11- Adicionar 100 µl do substrato. Incubar no escuro por aproximadamente 10-15 minutos.

Substrato : 50 ml de H₂O, 25 ml de ácido cítrico 0.2M , 25ml de Na₂HPO₄ 0.4M, 1 comprimido de OPD (30 mg), 40 µl H₂O₂.

12- Parar a reação com 50 µl de H₂SO₄, quando aparecer a coloração amarela

13- Realizar a leitura em espectrofotômetro (leitor de ELISA) a 492 nm.

7.4. Protocolo de transfecção com CaCl₂

- Plaquear as células 24 horas antes da transfecção. As células devem estar em 60-70% de confluência.
- Misturar os reagentes sob agitação constante. Gotejar lentamente o CaCl₂, por último, para evitar a formação de precipitados.

12,5 ul CaCl₂ 2,5 M
125 ul HBS
1 ul DNA (1 ng/ul)
H₂O QSP para 250 ul

- Adicionar na células cultivadas sob leve agitação, gotejando lentamente.
- Após 8 horas, trocar o meio
- Após 24 horas da troca do meio, recolher o sobrenadante, centrifugar por 10 minutos a 10000 RPM e recolher o sobrenadante. Armazenar a -20°C.

8. Anexo II

8.1. Parâmetros de minimização de energia e dinâmica molecular utilizados no programa Q e no GROMACS

8.1.1. Minimização de energia no GROMACS

```
cpp                = /lib/cpp
define             = -DFLEX_SPC
constraints        = all-bonds
integrator         = steep
nsteps            = 10000
;
;   Energy minimizing stuff
;
emtol              = 0.10
emstep            = 0.01
coulombtype       = PME
nstcomm           = 1
ns_type           = grid
rlist             = 1
rcoulomb          = 1.0
rvdw              = 1.0
Tcoupl            = no
Pcoupl            = no
gen_vel           = no
```

8.1.2. Equilíbrio 1

```
title           = PEP MD
cpp             = /lib/cpp
define          = -DPOSRES
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 0.0
dt             = 0.001 ; ps !
nsteps         = 1000000 ; total 1 ns.
nstcomm        = 2500
nstxout        = 10000
nstvout        = 10000
nstfout        = 0
nstlog         = 10000
nstenergy      = 10000
nstlist        = 10
ns_type        = grid
rlist          = 0.9
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 1.4
fourierspacing = 0.12
fourier_nx     = 0
fourier_ny     = 0
fourier_nz     = 0
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes
unconstrained-start = yes
comm_grps      = Protein
comm_mode      = Linear

; Berendsen temperature coupling is off in two groups
Tcoupl         = berendsen
tc-grps        = Protein Other
tau_t          = 0.1 0.1
ref_t          = 100 100

; Energy monitoring
energygrps     = April T1 T2 T3 SOL

; Isotropic pressure coupling is on
Pcoupl         = berendsen
Pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p          = 1.0

; Generate velocities is on at 200 K.
gen_vel        = yes
gen_temp       = 200.0
gen_seed       = 258732
```

8.1.3. Equilíbrio 2

```
title                = PEP MD
cpp                  = /lib/cpp
define               = -DPOSRES
constraints          = all-bonds
integrator           = md
tinit                = 0.0
dt                   = 0.001 ; ps !
nsteps               = 1000000 ; total 1 ns.
nstcomm              = 2500
nstxout              = 10000
nstvout              = 10000
nstfout              = 0
nstlog               = 10000
nstenergy            = 10000
nstlist              = 10
ns_type              = grid
rlist                = 0.9
coulombtype          = PME
rcoulomb              = 0.9
rvdw                 = 1.4
fourierspacing       = 0.12
fourier_nx           = 0
fourier_ny           = 0
fourier_nz           = 0
pme_order            = 4
ewald_rtol           = 1e-5
optimize_fft         = yes
unconstrained-start = yes
comm_grps            = Protein
comm_mode            = Linear

; Berendsen temperature coupling is off in two groups
Tcoupl               = berendsen
tc-grps              = Protein Other
tau_t                = 0.1 0.1
ref_t                = 200 200

; Energy monitoring
energygrps           = April T1 T2 T3 SOL

; Isotropic pressure coupling is on
Pcoupl               = berendsen
Pcoupltype           = isotropic
tau_p                = 0.5
compressibility       = 4.5e-5
ref_p                = 1.0

; Generate velocities is on at 200 K.
gen_vel              = yes
gen_temp              = 200.0
gen_seed              = 1735229
```

8.1.4. Equilíbrio 3

```
title           = PEP MD
cpp             = /lib/cpp
define          = -DPOSRES
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 0.0
dt             = 0.001 ; ps !
nsteps         = 1000000 ; total 1 ns.
nstcomm        = 2500
nstxout        = 10000
nstvout        = 10000
nstfout        = 0
nstlog         = 10000
nstenergy      = 10000
nstlist        = 10
ns_type        = grid
rlist          = 0.9
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 1.4
fourierspacing = 0.12
fourier_nx     = 0
fourier_ny     = 0
fourier_nz     = 0
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes
unconstrained-start = yes
comm_grps      = Protein
comm_mode      = Linear

; Berendsen temperature coupling is off in two groups
Tcoupl        = berendsen
tc-grps       = Protein Other
tau_t         = 0.1 0.1
ref_t         = 300 300

; Energy monitoring
energygrps    = April T1 T2 T3 SOL

; Isotropic pressure coupling is on
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p         = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p         = 1.0

; Generate velocities is on at 200 K.
gen_vel       = yes
gen_temp      = 200.0
gen_seed      = 2361237
```

8.1.5. Dinâmica Molecular no GROMACS

```
title           = PEP MD
cpp             = /lib/cpp
constraints     = all-bonds
integrator      = md
tinit          = 0000.0
dt             = 0.0015 ; ps !
nsteps         = 20000000 ; total 30 ns.
nstcomm        = 1000
nstxout        = 10000
nstvout        = 10000
nstfout        = 0
nstlog         = 10000
nstenergy      = 10000
nstlist        = 10
ns_type        = grid
rlist          = 0.9
coulombtype    = PME
rcoulomb       = 0.9
rvdw           = 1.4
fourierspacing = 0.12
fourier_nx     = 0
fourier_ny     = 0
fourier_nz     = 0
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
optimize_fft   = yes
unconstrained-start = yes
comm_grps      = Protein
comm_mode      = Linear

; Berendsen temperature coupling is off in two groups
Tcoupl        = berendsen
tc-grps       = Protein      Other
tau_t         = 0.1          0.1
ref_t         = 310          310

; Energy monitoring
energygrps    = April      T1      T2      T3      SOL

; Isotropic pressure coupling is on
Pcoupl        = berendsen
Pcoupltype    = isotropic
tau_p         = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p         = 1.0
```

8.1.6. Minimização com o programa Q

```
[MD]
steps                40000
stepsize             1.0
temperature           1.0
bath_coupling        1.0
random_seed          8427
initial_temperature  1.0
lrf                  on

[intervals]
non_bond              25
output                10

[files]
topology              april_443.top
final                 eq01.re
fep                   april_443.fep
```

8.1.7. Dinâmica molecular com o programa Q

```
[MD]
steps                5000000
stepsize             1.00
temperature           310.0
bath_coupling        10
lrf                  on

[intervals]
non_bond              25
output                10
energy                250
trajectory            500

[trajectory_atoms]
not restrained

[files]
topology              april_443.top
final                 md5ns.re
energy                md5ns.en
restart               eq01.re
fep                   april_443.fep
trajectory            md5ns.dcd
```

9. Anexo III

Searching for binding specificity between TACI and its ligands APRIL and BAFF: New insights on human APRIL-TACI specificity using molecular dynamics and free energy evaluation

João Hermínio Martins da Silva^{a,c}, Wilson Savino^a, Michael Hahne^b, and Ernesto Raúl Caffarena^{c*}

a) Laboratório de Pesquisa sobre o Timo. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21041-250

b) Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS-UMR 5535, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier- Cedex 5 – France; Université Montpellier 1, Montpellier, France; Université Montpellier 2, Montpellier, France;

c) Programa de Computação Científica (PROCC). Fundação Oswaldo Cruz. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21041-250

(*) Corresponding author

Address:

Programa de Computação Científica (PROCC). Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Antiga Residência Oficial - Manguinhos.

CEP: 20245-900 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Tel.: +55-21-38 36 11 02;

Fax: +55-21-38 36 11 32;

E-mail:ernesto@fiocruz.br

Abstract

Alanine scanning mutagenesis of protein–protein interfacial residues can be applied to a wide variety of protein complexes to elucidate structural and energetic characteristics of the hot-spots (residues which contribute to the Gibbs free energy of binding). Binding free energies have been estimated in other studies with reasonable accuracy using semi-empirical methods such as Linear Interaction Energy. The main objective of this work is the application of a computational approach to predict approximate differences in binding free energies between the wild-type and alanine mutated complexes ($\Delta\Delta G$ binding), associating molecular dynamics and site directed mutagenesis, as well as the parameterization of the α and β calibration coefficients, associated with non polar and electrostatic potential, respectively. The method was applied to the APRIL-TACI and BAFF-TACI ligand/receptor complexes. The formation of very stable salt-bridges between R84 and D85 from TACI and BAFF contribute to the specificity. The calculated $\Delta\Delta G$ values for both APRIL and BAFF they confirm their relevance as potential candidates for mutation. Additionally, the dynamical analysis suggest the TACI R84 and D85 residues as potential candidates to mutation, seeking to increase the affinity between TACI_d2 and APRIL. Taken together, in this detailed computational study by means of molecular modeling we extend present knowledge of TACI interactions with its ligands APRIL and BAFF. In addition to the previously described significance of the DXL motif in TACI-ligand binding we identify new hot spots for these interactions. These quantitative predictions will help in designing inhibitors of APRIL by anticipating the experimental results of mutagenesis, thus guiding new investigations and saving time on experimental work.

Keywords: TNF, APRIL, TACI, Alanine Scanning Mutagenesis, Free Energy, Linear Interaction energy

Introduction

Proteins of the Tumor Necrosis Factor (TNF) superfamily are implicated in the regulation of essential biological processes including cell proliferation, differentiation, survival and death [1]. The altered expression of TNF family members is often associated with pathological situations, such as autoimmune diseases and cancer [2]. The TNF like ligand APRIL (a proliferation-inducing ligand, TNFSF13), has been initially described and named for its capacity to stimulate tumor cell proliferation *in vitro* [3]. APRIL acts solely as a secreted factor [4] and, under physiological conditions, is mainly produced by hematopoietic cells such as monocytes, dendritic cells, macrophages and T cells (reviewed in [5]). Like other members of the TNF superfamily, APRIL is a homotrimer with a stranded extracellular TNF homology domain (THD). Initially, APRIL is produced as a type II transmembrane protein, being secreted after cleavage in the Golgi apparatus by furin-like proteases [4]. High levels of APRIL mRNA are detectable in transformed cell lines and in human primary tumors such as colon, thyroid and lymphoid carcinoma. [3] It has also been shown that APRIL–transfected murine fibroblasts NIH3T3 proliferate more rapidly in immunodeficient mice, and that tumor growth of carcinomas expressing APRIL endogenously can be blocked by a soluble APRIL receptor [3,6]. Likewise, overexpression of APRIL in mice favors the development of B cell neoplasms *in vivo*. [7]

Currently, two receptors for APRIL are known, named BCMA and TACI, which are expressed mainly on B cells (reviewed in [5]) and also bind to BAFF (BLyS , TNFSF13-B), another TNF family protein that shares a high structural identity with APRIL. TACI is a member of the TNFR superfamily possessing two cysteine rich domains (CRDs). It has been found that only the membrane-proximal CRD (TACI_{d2}) is required for high affinity binding to either APRIL or BAFF. [8] By surface plasmon resonance competition experiments, the 42-residue TACI_{d2} fragment was found to have high affinity for both APRIL and BAFF (IC₅₀=6 and 2 nM, respectively). [8] BAFF is also able to bind to a specific receptor called BAFF-R, whereas APRIL can bind to heparan sulfate proteoglycans (HSPG). [9,10] As BAFF is an essential factor for B cell homeostasis, soluble BCMA or TACI-receptor molecules do not only block APRIL binding and subsequent events, but also B cell development. Moreover, APRIL and BAFF share approximately 30% of sequence identity and most of their functions are non-redundant, seen in different phenotypes of APRIL and BAFF deficient and transgenic mice. [11-13]

From a structural viewpoint, these three TNF family receptors (BAFF-R, BCMA and TACI) present a conserved hexapeptide (Phe/Tyr/Trp)-Asp-X-Leu-(Leu/Val)-(His/Arg/Glu), usually referred as DXL motif, which adopts a type I β -turn structure and seems to be essential for ligand binding [7]. Both normal and tumor cell lines

proliferate in response to APRIL stimulation *in vitro*, which can be blocked by administration of soluble B-cell maturation antigen (BCMA).[6] Interestingly, it has been recently reported a series of ten classes of peptides able to block the APRIL-BCMA interaction through phage display, out of which only one holds the DXL motif [14]. Nevertheless, the binding mode of this series of peptides, containing or not the DXL motif, resembles the one found between TACI-APRIL and BCMA-APRIL, as observed in the crystal structure of both complexes.

Given that APRIL over-expression is related with many malignancies, mostly dominant over BAFF expression, we applied a fast computational methodology to detect the essential amino acids involved in the recognition process (hot spots).

Crystal structure information of various TNF-type receptors and ligands, including APRIL [15] and the complexes formed between BCMA and TACI and their cognate ligands [8], are available in the Protein Data Bank. [16]

Computational methodologies are useful to determine protein–protein specificity. Among them computational alanine scanning method has been widely employed for the identification of relevant residues, in both protein–protein and protein–small peptide complexes. [17-19] This determination can provide insights on the factors that control affinity and binding preference within a protein–protein interaction network, potentially useful for pharmacological oriented efforts.

The Linear Interaction Energy (LIE)[20] method was successfully applied, to study point mutations of protein complexes [21,22]. Briefly, with this methodology is possible to calculate the absolute binding free energy of a ligand as the change in free energy when transferred from solution (free state) to the solvated receptor binding site (bound state).

The binding free energies were estimated according to Equation 1:

$$\Delta G_{bind} = \alpha(\langle U_{l-s}^{LJ} \rangle_{bound} - \langle U_{l-s}^{LJ} \rangle_{free}) + \beta(\langle U_{l-s}^{el} \rangle_{bound} - \langle U_{l-s}^{el} \rangle_{free}) + \gamma \quad [1]$$

where U^{el} and U^{LJ} are the electrostatic and Lennard-Jones interaction energies between ligand and its surroundings in the binding site (bound) and in aqueous solution (free), respectively. The brackets $\langle \rangle$'s represent MD ensemble averages over molecular dynamics simulations trajectory, being α , β and γ empirical parameters. Originally, Aqvist et al.[20] tested semi-empirical parameters that produced calculated binding free energies in good agreement with experimental data using endothiapepsin bound to a set of different inhibitors. Later on, Hansson et al [23] determined a suitable set of electrostatic parameters according to the physicochemical

characteristics of the ligand together with a non polar value of $\alpha = 0.181$ to adequately reproduce the binding free energies for a variety of ligand-protein systems. This methodology presents some advantageous features, including simplicity, small system size, absolute binding energies calculation and short simulation times, among others.

The combination between computational alanine scanning and LIE is highly advantageous to detail the dynamical behavior between ligand and receptor. In this work, we performed a systematic mutagenesis in each of the 34 amino acids of TACI_d2 structure utilizing computational alanine scanning. [24]

The analysis of results allowed us to suggest potential specific mutations in TACI to enhance the affinity for APRIL as well as propose new target residues.

Methods

The coordinates of human APRIL protein were obtained based on the murine structure by Comparative Modeling, performed with Modeller software.[25] The alignment between human and murine APRIL sequences (Figure 1) was done using the Align software from EMBOSS package [26], employing the Blosum62 matrix with gap penalties of 10 and 0.5 for open and extended, respectively. Sequences were retrieved from the Entrez Protein Database, under the access numbers AAL90442.1 and AAG22534.1, respectively. Template coordinates from murine APRIL were taken from 1XU1 pdb entry [8], whereas coordinates for human BAFF were obtained from the 1KXG pdb file. [7] The TACI_d2 protein, also taken from 1XU1 pdb file, was regarded as a common receptor for both APRIL and BAFF.

-----Fig1-----

To evaluate the overall model quality, Procheck [27], Verify3D [28] and Errat softwares [29], were applied.

For computational alanine scanning essays, all TACI_d2 amino acids, except Cys and Ala, were punctually mutated to Ala using the SPDB-VIEWER program. [30] Application of this methodology for calculating $\Delta\Delta G$ values required simulations in four different environments: APRIL-TACI wild type complex (native), APRIL-TACI alanine mutated complex, TACI wild type in water and TACI alanine mutated in water. Hot spots were defined as residues showing a $\Delta\Delta G$ binding value larger than or equal to 2 kcal/mol [31] when mutated to alanine.

Estimated $\Delta\Delta G$ were simply calculated as the difference between mutated and native ΔG values (Equation 2) and corrected for the ionizable amino acids by adding the term $1.35|\text{pH}-\text{Pka}|$, [32] resulting in correction terms of 7.43, 5.0, 3.38 and 4.05 for Arg, Lys, Glu, Asp, respectively, consistent with neutral pH.

$$\Delta\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_{\text{binding-mutant}} - \Delta G_{\text{binding-wild type}} \quad [2]$$

Absolute free energies calculations (ΔG) were computed using the LIE method with Q software package [33] employing the Gromos96 force field. [34] Standard coefficient parameterization, determined by Hansson et al ($\alpha=0.181$, $\beta=0.5$, 0.43, 0.37, 0.33 for charged, dipolar with no hydroxyl groups, dipolar with one hydroxyl group and dipolar with two or more hydroxyl groups, respectively)[23], was used to perform calculations. The Ca -atom of each TACI_d2 residue was defined as the center of a 20 Å radius sphere. The systems were hydrated with the

SPC water model. [35] Atoms outside the 18.5 Å sphere were strongly restrained (harmonic restraint of 200 kcal mol⁻¹ Å⁻²). Non-bonded interactions across the boundary were excluded and inner electrostatic and Lennard-Jones interactions energies were calculated without cut-off restrictions while long-range electrostatics were treated using a multipole expansion [36]. Ionizable residues within a 10 Å sphere from the selected amino acid were kept charged, while residues near to the boundary edge were held neutral.

A weak coupling external bath was used to maintain the temperature at 310K, with a relaxation time of 10 fs. SHAKE algorithm was utilized to constrain bonds and angles of solvent molecules. [37]

The systems were equilibrated for over 1 ns to stabilize ligand-surrounding interactions before achieving the data collection phase, consisting in a further nanosecond. Overall, MD simulations totalized 2ns and were performed with a step size of 1 fs.

Stability was assured by comparing the average energy values of the first and second halves of the collection period, based on the statistical inefficiency concept. [38]

The atomistic Solvent Accessible Surface (SAS) covered by each residue before and after the dynamics was calculated by NACCESS [39]. Surface accessible residues were then defined as those that possess a relative SAS $\geq 5\%$. [40]

Results and discussion

Homology Modeling of Human APRIL

The general stereochemical evaluation performed by Procheck indicated a very good quality of the human APRIL homology model. The Ramachandran plot showed 89.8% of the residues located in the allowed region, while 10.2% were in the additionally allowed region. According to Verify3D results, 89.86% of the residues presented averaged 3D-1D score higher than 0.2. The ERRAT plot showed an overall quality factor of 94.8%, which is below 95%, regarded as the upper limit to be considered as a high quality model.

Hot-spots determination

The analysis of the sequence alignment between APRIL and BAFF (Figure 3) revealed that both molecules present either conserved or conservatively mutated hot-spots.

Computational alanine scanning mutagenesis became a suitable procedure for both hot-spots detection and analysis of a wide range of protein–protein interfaces. In addition, it allows the calculation of the energetic contributions of individual side-chains to protein binding. Previous reports have used the alanine scanning technique for proving the importance of particular residues between contact interfaces [41,17,24,22].

The determination of hot spots and other important residues, disturbing little or nothing the affinity between TACI and BAFF, can help in the design of APRIL specific sequences. The available experimental results [9,5,42,10], regarding the affinity of TACI/APRIL, TACI/BAFF, BCMA/APRIL, and BCMA/BAFF complexes, present some degree of controversy, and consequently hinders the calibration of LIE equation through α , β and γ coefficients. Therefore, we adopted the standard parameterization determined by Hansson et al ($\alpha=0.181$, $\beta=0.5$, 0.43 , 0.37 , 0.33 for charged, dipolar with no hydroxyl groups, dipolar with one hydroxyl group and dipolar with two or more hydroxyl groups, respectively)[23] to perform calculations. In this line, it is important to bear in mind that these results indicate a qualitative trend rather than a precise energy value for TACI binding specificity, since LIE coefficients were not specifically obtained for this system.

The individual energy contributions to the relative binding free energy include the electrostatic (Eel) and van der Waals energies (EvdW) and are described in Table 1. The spectrum of $\Delta\Delta G$ for APRIL and BAFF obtained after alanine mutation is shown in Figure 2.

-----Table1-----

-----Fig2-----

We identified six essential residues (R72, K73, E74, K77, D80, and K98,) for the APRIL-TACI binding, in accordance with the hotspot definition. R72 and E74 can form intramolecular salt bridges, while the ensemble formed by R72, K73 and K98 compose a positively charged cluster, which makes direct contacts with the negatively charged APRIL loop encompassing D129, D130 and D132 residues. Interestingly, K98 is also able to hydrogen bond solvent molecules in the surrounding of this loop. Additionally, L82, R84 and D85 complement the set of BAFF hot spots.

The R84 and D85 residues, directly involved in the TACI and BAFF recognition process, present noticeable differences in their free energy profiles. Their negative values for APRIL indicate that these residues are not crucial and might be mutated without disrupting the binding to TACI.

The conservation/substitution of hot-spot residues bound to the TACI DXL motif, formed by D80, H81, and L82 residues is probably one of the most important factors to determine selectivity [8], since this loop appears as the major recognition site for both APRIL and BAFF.

From the structural viewpoint, H81, R84 and D85 are localized in between two APRIL monomers, binding both simultaneously. In TACI, D80 and L82 are buried, while H81 is highly exposed to the solvent and when substituted by A81 presented a $\Delta G = 1.5$ kcal/mol confirming this residue as a non-essential component for APRIL, unlike BAFF, whose slightly positive ΔG value (0.08kcal/mol) suggested a more relevant role. It is noteworthy that the DXL specific loop is conserved in other APRIL/BAFF receptors, such as BCMA (DSL) and BR3 (DLL).

Comparison with Experimental Data and Robetta Analysis

Robetta [43] is a well established energy-based computational alanine scanning server which has become the *de facto* standard for comparison in the field. Thus, the static TACI/APRIL, TACI/BAFF structures were submitted to the analysis. In a glimpse, the Robetta server showed that D80 and L82 were coincidentally pointed as important residues for APRIL, but only the second was marked as being relevant for BAFF. L83 and R84 were also pointed out as important residues for APRIL but not D85, and none of these were indicated as important ones for BAFF. Q95 appears as a hot-spot for both, APRIL and BAFF but not K98, as evidenced by our simulation results.

TACI-APRIL/BAFF hot-spots obtained by MD simulations and Robetta server are shown in Figure 3.

-----Fig3-----

The discrepancies observed between these two approaches can be assigned to some substantial methodological differences such as the lack of atomic mobility and explicit solvent in Robbeta calculations. In general, the modifications identified by molecular dynamics, such as hydrophobic effects and water bridged contacts are not detected by other static methodologies.

On the other hand, Hymowitz *et al.* [8] have experimentally analyzed the murine APRIL/TACI_{d2} (human) co-crystal and detected qualitatively a set of four important residues to APRIL recognition (F78, Y79, I92, P97), two for BAFF only (R84, Q95) and six for APRIL and BAFF simultaneously (D80, L82, L83, I87, G94, H96). It is noteworthy that the surrounding region of the DHL motif appears as potentially mutable in agreement with our analysis.

Finally, the consensus among the experimental and theoretical approaches reveals the importance of residues D80 and L82, constituting well defined hot-spots for binding to APRIL and BAFF. Differently, H81 arises as a non-crucial residue, and thus could be mutated to other negatively charged residue, taking into account the positively charged environment of the pocket where the DXL motif is inserted. R84 and D85 come up as good candidates for mutations to increase APRIL specificity for TACI.

	ΔG WT	ΔG Mut	ΔU^{el} WT	ΔU^{vdw} WT	ΔU^{el} Mut	ΔU^{vdw} Mut
R72	1.73 \pm 1.99	0.33 \pm 1.49	-120.82 \pm 2.46	-13.08 \pm 0.79	-31.59 \pm 1.24	-13.18 \pm 0.71
K73	-8.30 \pm 2.44	0.06 \pm 1.02	-167.24 \pm 3.84	-12.45 \pm 0.47	-32.78 \pm 1.19	-12.67 \pm 0.86
E74	-0.84 \pm 3.19	0.16 \pm 0.74	-213.26 \pm 5.58	-9.83 \pm 0.44	-33.20 \pm 0.79	-10.66 \pm 0.49
Q75	-0.27 \pm 1.28	1.00 \pm 1.39	-48.93 \pm 1.60	-9.32 \pm 0.47	-31.94 \pm 2.30	-10.67 \pm 0.94
G76	0.40 \pm 1.15	0.11 \pm 1.88	-31.27 \pm 1.18	-12.82 \pm 1.77	-31.84 \pm 0.47	-14.02 \pm 0.65
K77	1.18 \pm 1.60	0.68 \pm 1.42	-140.35 \pm 2.06	-14.14 \pm 1.10	-29.59 \pm 1.07	-14.83 \pm 0.36
F78	0.07 \pm 0.64	-0.34 \pm 0.79	-32.54 \pm 0.39	-14.79 \pm 0.56	-31.10 \pm 0.97	-14.91 \pm 0.45
Y79	0.13 \pm 1.57	-0.09 \pm 1.11	-48.48 \pm 1.50	-14.31 \pm 0.84	-32.58 \pm 1.31	-13.06 \pm 0.43
D80	1.16 \pm 2.68	-0.23 \pm 1.34	-162.82 \pm 4.82	-15.52 \pm 0.39	-30.66 \pm 2.36	-14.58 \pm 0.55
H81	1.10 \pm 1.61	-0.41 \pm 0.48	-50.04 \pm 3.07	-11.00 \pm 0.37	-34.53 \pm 0.53	-10.77 \pm 0.30
L82	-0.41 \pm 0.53	0.11 \pm 0.65	-33.09 \pm 0.77	-9.68 \pm 0.25	-33.83 \pm 1.27	-11.36 \pm 0.30
L83	1.39 \pm 1.26	-0.06 \pm 1.35	-29.36 \pm 1.64	-13.55 \pm 1.19	-29.10 \pm 1.01	-13.87 \pm 0.92
R84	23.11 \pm 2.12	0.12 \pm 0.56	-130.34 \pm 3.53	-9.47 \pm 0.38	-32.50 \pm 0.56	-10.43 \pm 0.26
D85	26.65 \pm 0.52	-0.23 \pm 0.52	-70.10 \pm 12.26	-13.31 \pm 0.29	-29.38 \pm 0.48	-13.55 \pm 0.48
I87	0.31 \pm 0.67	-0.01 \pm 0.65	-31.25 \pm 0.77	-13.21 \pm 0.55	-31.36 \pm 0.37	-15.02 \pm 0.52
S88	0.48 \pm 1.28	-0.37 \pm 0.73	-47.69 \pm 1.65	-12.91 \pm 0.44	-32.48 \pm 0.96	-13.49 \pm 0.29
S91	-0.23 \pm 2.30	-0.55 \pm 0.40	-47.45 \pm 4.30	-10.31 \pm 0.22	-33.24 \pm 0.64	-11.18 \pm 0.41
I92	1.04 \pm 1.05	0.35 \pm 1.13	-28.37 \pm 1.77	-12.86 \pm 0.71	-29.95 \pm 1.73	-13.72 \pm 0.82
G94	0.34 \pm 0.76	-0.05 \pm 0.58	-32.85 \pm 0.52	-8.81 \pm 0.48	-33.48 \pm 0.61	-9.32 \pm 0.30
Q95	1.13 \pm 1.09	-0.08 \pm 0.76	-45.33 \pm 1.93	-11.11 \pm 0.44	-31.03 \pm 0.90	-12.00 \pm 0.71
H96	0.24 \pm 2.42	0.45 \pm 1.13	-33.93 \pm 2.74	-11.05 \pm 0.94	-17.92 \pm 1.19	-11.22 \pm 0.77
P97	0.79 \pm 0.81	1.05 \pm 1.51	-17.24 \pm 0.65	-9.76 \pm 1.05	-32.03 \pm 1.75	-12.40 \pm 1.20
K98	2.27 \pm 1.81	0.37 \pm 0.68	-163.75 \pm 2.86	-10.50 \pm 0.39	-34.21 \pm 0.99	-9.92 \pm 0.59
Q99	-1.38 \pm 2.39	-0.40 \pm 0.86	-46.20 \pm 2.87	-10.75 \pm 0.42	-34.23 \pm 1.26	-10.96 \pm 0.90
Y102	0.45 \pm 0.97	-0.04 \pm 0.84	-49.84 \pm 1.04	-9.74 \pm 0.78	-32.82 \pm 0.32	-10.41 \pm 0.41
F103	0.37 \pm 0.88	-0.44 \pm 0.62	-34.86 \pm 0.74	-11.39 \pm 0.37	-33.85 \pm 0.94	-10.89 \pm 0.87

Table 1 - Individual energy contributions to the relative binding free energy: electrostatic energy (Eel) and van der Waals energy (EvdW)

Structural features of hot-spots

For a more accurate description of protein-protein interaction and its effects, structural and thermodynamic analyses provide complementary information and both are needed. A SAS description, together with the analysis of the most significant specific interactions between TACI_d2 hot spots and its ligands is given hereafter.

It has been demonstrated that inaccessibility to the solvent is a necessary condition for a residue to become a binding hot-spot [44,45]. So, we investigated the Solvent Accessibility Surface (SAS) of the APRIL and BAFF hot-spots and the results are depicted in Figure 4.

-----Fig4-----

Practically, all hot spot residues had their exposed surface decreased or unchanged over dynamics. D80 and L82 remained totally buried while R84 and D85, less important for APRIL, showed variations below 1%, maintaining their side chains exposed to the solvent, evidencing their participation in the recognition process.

In between D80 and D85 there is R84, which is responsible for a strong electrostatic interaction with APRIL binding site. This statement was supported by APBS calculations, showing a high degree of electrostatic complementarity between TACI receptor and APRIL/BAFF ligands.

The more drastic variation among SAS values, before and after simulations, is presented by the amino acid K73. At the beginning, with more than 49% of its side chain particularly exposed, ending up with only 24.4%, in extreme contact with APRIL. This drop-off can be an indicative of the key importance of this residue for the APRIL binding.

-----Fig5-----

Unlike other hot spots that steadily contact APRIL, R84 and D85 presented abrupt conformational transitions, ascertained by an increase of their RMSD values, ranging from almost 2Å to 11Å and 6Å, respectively (see Figure 5). Additionally, R84 hydrogen bonds to T79 at the beginning of the simulation, but this interaction was rapidly disrupted, enhancing the RMSD value. The high stability of R84 in BAFF simulations is likely associated with the formation of salt bridges, with D276 and D278. On the other hand, no salt bridges between TACI and APRIL were observed, although transient hydrogen bonds were sparsely detected. D85 was not involved in any evident specific interaction, neither with APRIL nor BAFF.

The TACI D80 side chain also forms a very stable salt bridge with guanidine terminal of R231 from APRIL, at an average distance of $3.2 \pm 0.3 \text{ \AA}$. Therefore, it is very clear the role played by this residue in the maintenance of the TACI-APRIL interaction. Furthermore, the solvation change in D80 did not seem to contribute to the binding, since the $\Delta\Delta U^{\text{el}}$ and $\Delta\Delta U^{\text{vdw}}$ were similar for both free and complex states.

Conclusion

In summary, the presented results elucidated the energetics of TACI in complex with two ligands, APRIL and BAFF, using LIE and molecular dynamics simulations. The LIE methodology was successfully employed to identify, albeit qualitatively, new hot-spots in TACI_d2 receptor in complex with APRIL. The energetic analysis suggested that the electrostatic interactions were more relevant than Lennard-Jones ones. Additionally, an important net of hydrogen bonds between TACI and its ligands, APRIL and BAFF, contributed to a stable protein-protein complementarity. Molecular dynamics associated with free energy calculations showed that H81, L83, R84, D85, and I92 specifically interacted with APRIL. Moreover, R84 and D85 arose as crucial residues only for BAFF, especially due to the formation of very steady salt-bridges. It was also confirmed the relevance of the DXL motif in the recognition process, in agreement with previous experimental results. [8]

These findings can help the design of new specific antagonists against APRIL. The knowledge of specific hot-spots, obtained by dynamical studies as described herein, could be employed to improve specificity and efficiency of soluble APRIL receptors. The combination of computational alanine scanning, LIE and molecular dynamics methodologies is promising and can be applied to other protein-protein complexes.

Acknowledgements

MH was supported by the CNRS (program PICS n° 4317) and the Société Française de Rhumatologie (SFR).

References

1. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (9):3666-3670
2. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104 (4):487-501
3. Hahne M, Kataoka T, Schroter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, Schneider P, Bornand T, Holler N, French LE, Sordat B, Rimoldi D, Tschopp J (1998) APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 188 (6):1185-1190

4. Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar JP, Hahne M (2001) Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep* 2 (10):945-951

kve198 [pii]

5. Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, Novak AJ (2006) An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5 (3):235-246.

10.1038/nrd1982

6. Rennert P, Schneider P, Cachero TG, Thompson J, Trabach L, Hertig S, Holler N, Qian F, Mullen C, Strauch K, Browning JL, Ambrose C, Tschopp J (2000) A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med* 192 (11):1677-1684

7. Planelles L, Carvalho-Pinto CE, Hardenberg G, Smaniotto S, Savino W, Gomez-Caro R, Alvarez-Mon M, de Jong J, Eldering E, Martinez AC, Medema JP, Hahne M (2004) APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasm. *Cancer Cell* 6 (4):399-408

8. Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, Runyon S, Yan M, Yin J, Shriver SK, Gordon NC, Pan B, Skelton NJ, Kelley RF, Starovasnik MA (2005) Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem* 280 (8):7218-7227

9. Day ES, Cachero TG, Qian F, Sun Y, Wen D, Pelletier M, Hsu YM, Whitty A (2005) Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* 44 (6):1919-1931

10. Kimberley FC, van Bostelen L, Cameron K, Hardenberg G, Marquart JA, Hahne M, Medema JP (2009) The proteoglycan (heparan sulfate proteoglycan) binding domain of APRIL serves as a platform for ligand multimerization and cross-linking. *FASEB J* 23 (5):1584-1595

11. Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS (2004) Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (11):3903-3908

12. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML (2001) An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293 (5537):2111-2114

13. Varfolomeev E, Kischkel F, Martin F, Seshasayee D, Wang H, Lawrence D, Olsson C, Tom L, Erickson S, French D, Schow P, Grewal IS, Ashkenazi A (2004) APRIL-deficient mice have normal immune system development. *Mol Cell Biol* 24 (3):997-1006

14. Gordon NC, Lien S, Johnson J, Wallweber HJ, Tran T, Currell B, Mathieu M, Quan C, Starovasnik MA, Hymowitz SG, Kelley RF (2010) Multiple novel classes of APRIL-specific receptor-blocking peptides isolated by phage display. *J Mol Biol* 396 (1):166-177

15. Wallweber HJ, Compaan DM, Starovasnik MA, Hymowitz SG (2004) The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL. *J Mol Biol* 343 (2):283-290
16. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28 (1):235-242
17. Kortemme T, Kim DE, Baker D (2004) Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Sci STKE* 2004 (219):pl2
18. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ (2006) Unraveling the importance of protein-protein interaction: application of a computational alanine-scanning mutagenesis to the study of the IgG1 streptococcal protein G (C2 fragment) complex. *J Phys Chem B* 110 (22):10962-10969
19. Zoete V, Michielin O (2007) Comparison between computational alanine scanning and per-residue binding free energy decomposition for protein-protein association using MM-GBSA: application to the TCR-p-MHC complex. *Proteins* 67 (4):1026-1047
20. Aqvist J, Medina C, Samuelsson JE (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng* 7 (3):385-391
21. Almlof M, Aqvist J, Smalas AO, Brandsdal BO (2006) Probing the effect of point mutations at protein-protein interfaces with free energy calculations. *Biophys J* 90 (2):433-442
22. Brandsdal BO, Aqvist J, Smalas AO (2001) Computational analysis of binding of P1 variants to trypsin. *Protein Sci* 10 (8):1584-1595
23. Hansson T, Marelus J, Aqvist J (1998) Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *J Comput Aided Mol Des* 12 (1):27-35
24. Massova I, Kollman P (1999) Computational Alanine Scanning To Probe Protein-Protein Interactions: A Novel Approach To Evaluate Binding Free Energies. *Journal of the American Chemical Society* 121 (36):8133-8143
25. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234 (3):779-815
26. Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16 (6):276-277
27. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 26 (2):283-291
28. Bowie JU, Luthy R, Eisenberg D (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253 (5016):164-170
29. Colovos C, Yeates TO (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci* 2 (9):1511-1519
30. Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 (15):2714-2723

31. Kortemme T, Baker D (2002) A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (22):14116-14121.
32. Abul Qasim M, Ranjbar MR, Wynn R, Anderson S, Laskowski M, Jr. (1995) Ionizable P1 residues in serine proteinase inhibitors undergo large pK shifts on complex formation. *J Biol Chem* 270 (46):27419-27422
33. Marelius J, Kolmodin K, Feierberg I, Aqvist J (1998) Q: a molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. *J Mol Graph Model* 16 (4-6):213-225, 261
34. Daura X, Mark AE, Van Gunsteren WF (1998) Parametrization of aliphatic CH_n united atoms of GROMOS96 force field. *Journal of Computational Chemistry* 19 (5):535-547
35. Berendsen H, Postma J, WF VG, Hermans J (1981) Intermolecular Forces. In: BP (ed). Reidel: Dordrecht, p 331
36. Lee FS, Warshel A (1992) A local reaction field method for fast evaluation of long-range electrostatic interactions in molecular simulations. *J Chem Phys* 97 (5):3100-3107
37. Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HJC (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* 23 (3):327-341
38. Allen MP, Tildesley DJ (1987) *Computer simulation of liquids*. Clarendon Press; Oxford University Press, Oxford [England], New York
39. Hubbard SJ, Thornton JM (1993) 'NACCESS', computer program. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London
40. Jones S, Thornton JM (1997) Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches. *Journal of Molecular Biology* 272 (1):121-132
41. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ (2007) Computational alanine scanning mutagenesis--an improved methodological approach. *J Comput Chem* 28 (3):644-654
42. Gordon NC, Pan B, Hymowitz SG, Yin J, Kelley RF, Cochran AG, Yan M, Dixit VM, Fairbrother WJ, Starovasnik MA (2003) BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. *Biochemistry* 42 (20):5977-5983
43. Kim DE, Chivian D, Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res* 32 (Web Server issue):W526-531
44. Arkin MR, Randal M, DeLano WL, Hyde J, Luong TN, Oslob JD, Raphael DR, Taylor L, Wang J, McDowell RS, Wells JA, Braisted AC (2003) Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (4):1603-1608
45. Lo Conte L, Chothia C, Janin J (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol* 285 (5):2177-2198

Figure 1

Homo sapiens 114 QHSVLHLVPIINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVS 183
Mus musculus 105 KHSVLHLVPIINATSKD-SDVTEVMWQVLRGRGLQAQGDIVRVVDTGIYLLYSQVLFHDVTFTMGQVVS 173

Homo sapiens 184 REGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDI LSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFVKL 250
Mus musculus 174 REGQGRRETTLFR CIRSMPSD PDRAYNSCYSAGVFHLHQGDIITVKIPRANAKLSLSPHGTFLGFVKL 240

Figure 2

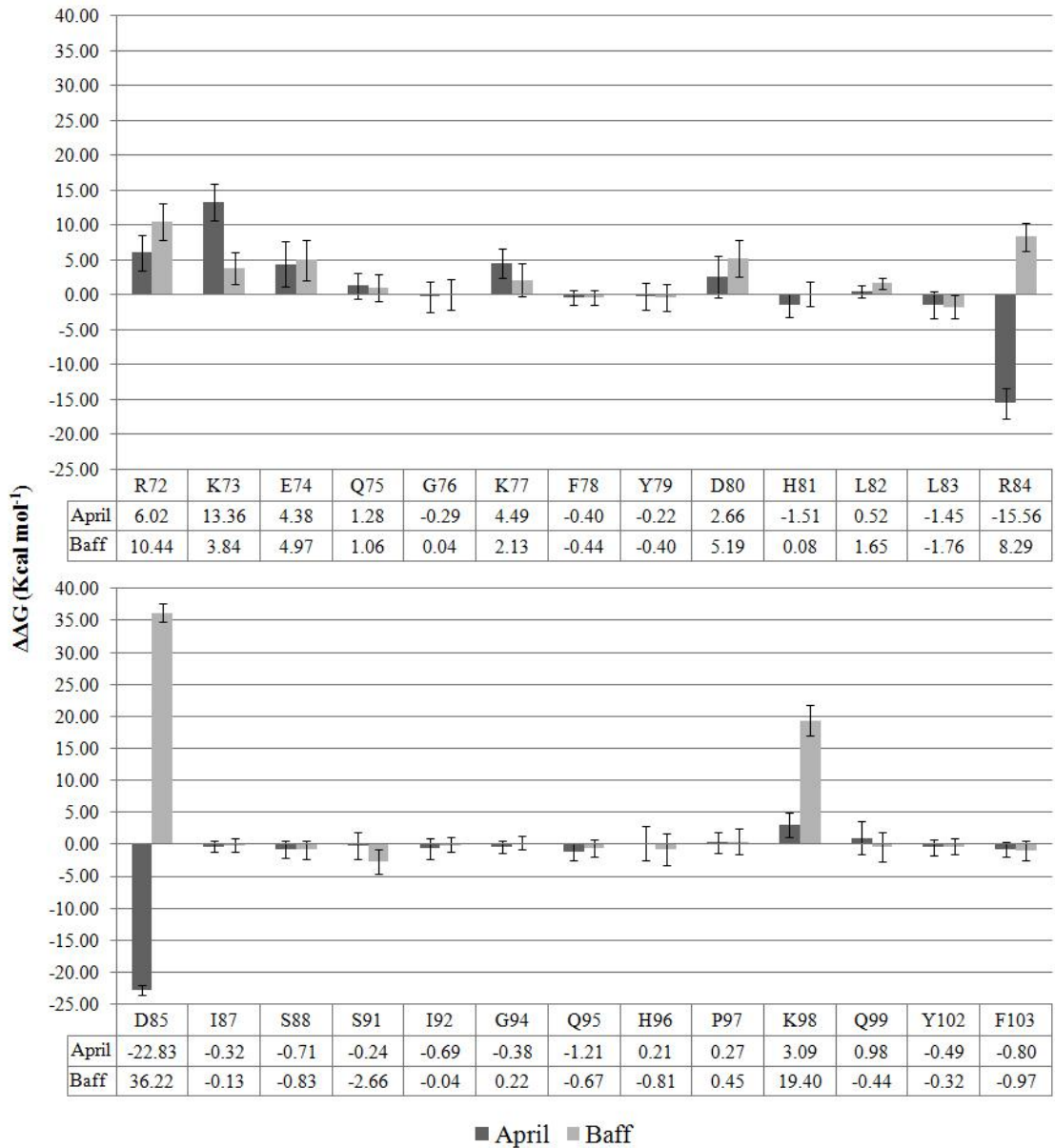


Figure 3



Figure 4

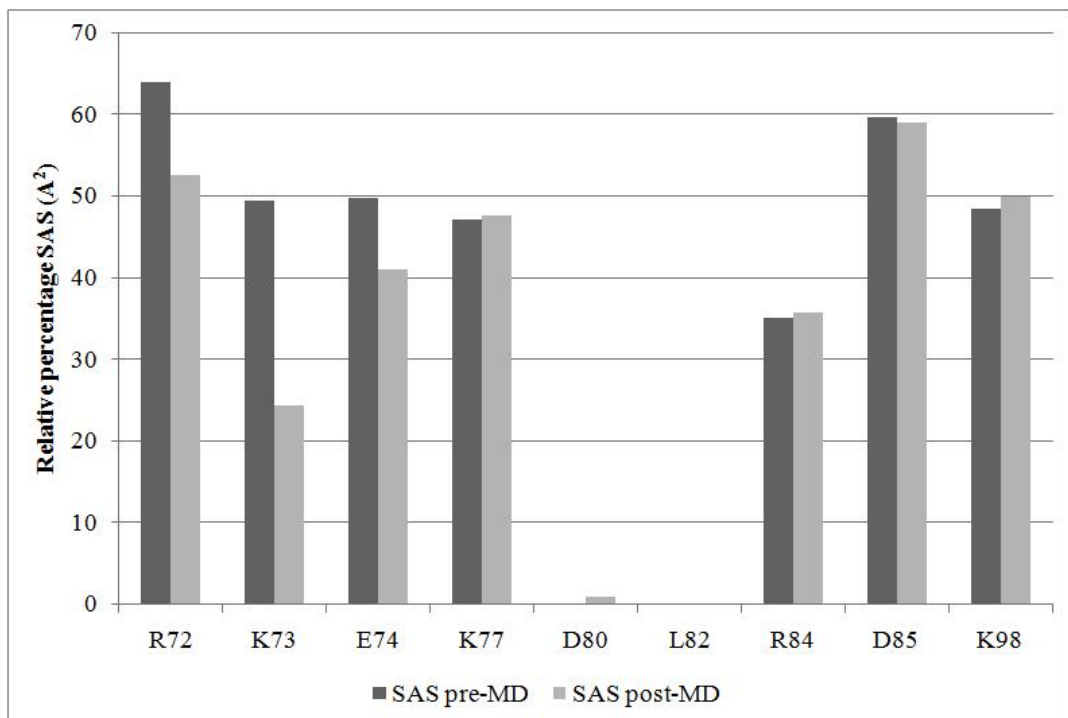


Figure 5

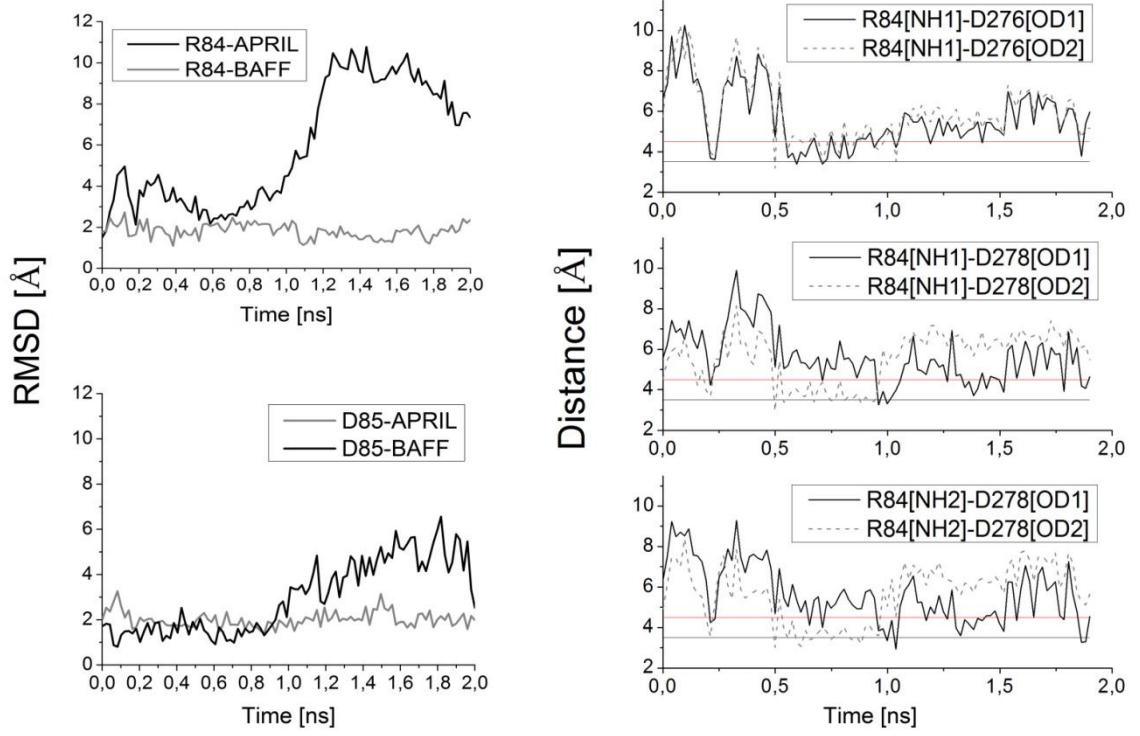


Figure captions

Figure 1 - Sequence alignment of human and murine extracellular portion of APRIL. The white highlighted residues are those that differ between the two species.

Figure 2 - Spectrum of $\Delta\Delta G$ values calculated for the TACI/APRIL and TACI/BAFF complexes. The free energy was calculated subtracting mutated and wild type ΔG values. Lower ΔG values indicate a beneficial mutation and higher values indicate relevant residues for the recognition.

Figure 3 – Hot-spots found between APRIL/TACI and BAFF/TACI according to Robetta server. The highlighted residues showed more than 1 Kcal/mol upon changed by alanine. The numbers correspond to the TACI sequence. The black lines show the cysteine bridges.

Figure 4 - Solvent Accessible Surface for TACI_d2 hot-spots. Black and grey columns account for initial and final configurations of TACI_d2 hot spots, respectively. Calculations were performed with NACCESS.

Figure 5 –RMSD for the R84 (A) and D85 (B) residues in simulations of TACI with APRIL (black line) and BAFF(grey line), respectively. C, D and E show the distances between charged groups forming a salt-bridge interaction between R84 and D276 for in APRIL/TACI_d2 complex. Constant red and blue lines indicate the range for a salt-bridge to be formed.