

**DANIEL FERREIRA DE LIMA NETO**

**“EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NO  
MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO  
DO VÍRUS DO MOSAICO DO TABACO”**

**CAMPINAS**

**2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**DANIEL FERREIRA DE LIMA NETO**

**“EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NO  
MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO  
DO VÍRUS DO MOSAICO DO TABACO”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
DANIEL FERREIRA DE LIMA NETO  
*[Assinatura]*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Clarice Weis Arns

CAMPINAS,  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L628e	<p>Lima Neto, Daniel Ferreira, 1979- Efeito da alta pressão hidrostática no mapeamento de epítopos da proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco / Daniel Ferreira Lima Neto. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Clarice Weis Arns. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Alta pressão hidrostática. 2. Mapeamento de epítopos. 3. Vírus do mosaico do tabaco. 4. Epítopos. 5. Bioinformática. I. Arns, Clarice Weins, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** High hydrostatic pressure effect on the epitope mapping of the tobacco mosaic virus

**Palavras-chave em Inglês:**

High hydrostatic pressure

Epitope mapping

Tobacco mosaic virus

Epitopes

Bioinformatics

**Área de concentração:** Microbiologia

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Clarice Weis Arns [Orientador]

Maurício Lacerda Nogueira

Paulo Eduardo Brandão

Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Carmen Lúcia Queiroga

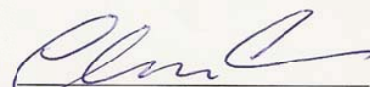
**Data da defesa:** 17-12-2012

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

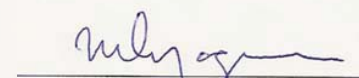
Campinas, 17 de dezembro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

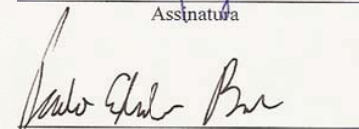
Prof(a). Dr(a). Clarice Weis Arns. (Orientadora)

  
Assinatura

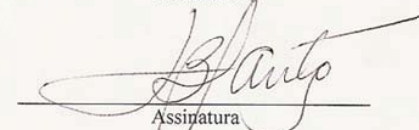
Prof(a). Dr(a). Maurício Lacerda Nogueira

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Paulo Eduardo Brandão

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Leonilda Maria Barbosa dos Santos

  
Assinatura

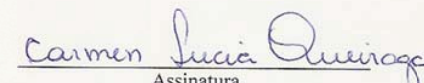
Prof(a). Dr(a). José Alberto Caram Souza Dias

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Milena Karina Coló Brunialti

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Carmen Lucia Queiroga

  
Assinatura

Prof(a). Dr(a). Marli Curcio

\_\_\_\_\_  
Assinatura

### **Agradecimentos**

Meu primeiro agradecimento é para a professora Clarice Arns por motivos profissionais e pessoais. No âmbito laboratorial, Clarice cuidou para que, até mesmo as disciplinas que eu escolhesse cursar, fossem relacionadas aos objetivos iniciais de doutoramento, relacionando cuidadosamente quais pessoas contatar e quais experimentos conduzir. Além disso, sempre conseguiu tempo para ouvir as mais mirabolantes ideias, pacientemente, para depois apontar os possíveis problemas e, portanto, da melhor maneira possível, permitir que eu tomasse a decisão mais adequada para a resolução das questões. Este tipo de aprendizado com o peso da responsabilidade dos próprios erros, em minha pouca experiência, é o maior diferencial daquela casa – principalmente por não ser tarefa simples e pelas óbvias implicações hierárquicas que esta professora optou por enfrentar no árduo processo de orientar-me. Por outro lado, é sempre muito difícil a adaptação a um novo ambiente, principalmente quando não se possui as habilidades sociais adequadas ou mesmo o perfil de comportamento do *status quo*. Apesar das minhas claras dificuldades, esta pessoa optou por guiar-me neste passo de desenvolvimento pessoal que, como percebem, foi evidentemente mais abrangente que apenas um doutoramento. De maneira alguma teria conseguido qualquer coisa sem que alguém acreditasse ser possível também – além da minha vontade. Obrigado professora!

Sem dúvida alguma, o segundo agradecimento deve ser ao professor Carlos Francisco Sampaio Bonafé também por inúmeras razões. Há aqui pouco espaço para descrever os eventos que levaram à aproximação dos trabalhos,

mas, em poucas palavras, ainda bem que assim se desdobrou a situação. O professor Carlos soube aliar doses de bom humor com seriedade de uma maneira até então não experimentada em minha rotina. Combinou críticas construtivas com momentos de descontração e interpretou corretamente em minhas reações quais os melhores cursos de ação para atingir os resultados necessários. Pacientemente, discutiu cada resultado, explicitando, desta forma, a necessidade de mais estudos por campo abordado – este cuidado também é raro e precioso. Além de incentivar bons gostos em leituras e músicas! E fora tudo isso, este cara é um grande amigo, que também divide espaço com o exemplo de professor que é. Obrigado professor!

Outro agradecimento muito importante deve ser endereçado ao pesquisador do CEMIB, Marcus Corat. Este indivíduo mostrou-se mais que profissional desde os primeiros momentos. Não apenas nas condições de diversão, mas principalmente nos acompanhamentos experimentais, fez-se presente e optou por contribuir ativamente sempre que pode. Por outro lado, é um daqueles amigos que podemos chamar quando precisamos pintar a casa, literalmente. Obrigado Marcus!

O Laboratório de Virologia Animal da UNICAMP tem a tradição de perpetuar o contato com os alunos que por ali passaram. Por conta desta característica, pude entrar em contato com pessoas muito importantes no meu desenvolvimento, além de conviver em um ambiente de intensa discussão e muito conhecimento. Duas pessoas de suma importância para o grupo são Paula e Geneci, ambos

responsáveis pelas engrenagens do laboratório – sejam elas desdentadas e/ou sujas ou lubrificadas e/ou brilhantes, sem distinção. Obrigado Paula, obrigado Geneci. Cada pessoa teve sua importância, como deve ser, mas com pequenas características individuais que fizeram toda a diferença. Matheus, Paulo, Márcia e Sônia, os veterinários de curso superior do LVA, obrigado pessoal – pelo convívio, respeito, amizade e, principalmente, pela ajuda e incentivo. Luciana Antoniassi, Luciana Kohn e Maria Ângela, a ala mais séria do LVA, obrigado pessoal – pelo meu crescimento pessoal que incentivaram, pelo companheirismo, respeito, integridade e profissionalismo que comigo compartilharam. Ao trio ternura: Marina, Juliana e Bianca, pelos bons momentos, mas, principalmente, pelos maus momentos, quando me ajudaram a manter a cabeça no lugar e olhar para frente – além de incentivar e participar dos journal clubs que fizemos! Obrigado meninas! Ninguém é perfeito e sem a ajuda de todos jamais aprenderíamos quem realmente somos; em nossa visão – enviesada por definição – estamos quase que sempre corretos. Dependemos, portanto, da combinação de interpretações externas para compormos um quadro maior sobre nós em um processo de *re*-conhecimento. Obrigado por tudo isso.

Ao Laboratório de Termodinâmica de Proteínas neste momento representado por Ancelmo e Juliana. Muito obrigado pelas inúmeras discussões científicas e também pelas oportunidades de descontração, sempre necessárias para temperar a vida.

Agradeço também aos professores Francisco Hideo Aoki do LPAIDS, juntamente com Angela Assis e Amilton. Pelos trabalhos gerados, pelas oportunidades e pela companhia. Obrigado!

Ao Laboratório de Biotecnologia e, em especial, ao professor Marcelo Lancellotti pelas orientações, amizade e principalmente pelos conflitos. Só crescemos quando nossas certezas são desfeitas, nos permitindo enxergar para além das nossas próprias limitações. Obrigado!

À Ordem.

Há duas pessoas importantes em minha história que não poderão participar dos eventos que seguirão.

Pai, a dor da sua passagem jamais permitirei que esvaeça. Guardo-a comigo em respeito a tudo que nos foi privado e como lembrete da brevidade das coisas. Gostaria de poder te ligar quando seu time perde e esperar o telefone tocar quando a recíproca é verdadeira. Obrigado meu pai.

Vó, nosso egoísmo já não enxergava mais suas batalhas e vitórias diárias, estava mais preocupado em perpetuar que respeitar. Obrigado minha avó.

À minha mãe, pessoa mais paciente que o próprio Gandhi, presente em todos os momentos e, principalmente, nos de maior desespero, sempre com uma palavra de paz e serenidade. Todas as páginas aqui escritas não preencheriam com justiça nem mesmo os primeiros agradecimentos que lhe devo. Deixemos isso para o próximo vino. Ti ringrazio tanto!



Ao meu irmão Henrique por simplesmente ser meu irmão. Companheiro, íntegro, sincero, Irmão. Infelizmente optou pelo sofrimento como vegetariano, não abandonou a própria sorte as pobres raízes e hortaliças. Qualquer versão de civilization, anytime, bring it on, wuss! Obrigado cara, mesmo.

Ao meu irmão mais novo Eduardo, pelo exemplo de coração que é, pelo homem que aí acorda e principalmente por tê-lo visto crescer e desenvolver o caráter que tem. Parabéns e obrigado pelo privilégio, mano.

À Elisete Antoniassi e família, por ter aceitado meu amor por sua filha e me acolhido como parte integrada, sem restrições.

À minha família, Ana Carolina Antoniassi e Lara Antoniassi Occhini. Vocês transformam minha realidade, resgataram sentimentos forçadamente esquecidos e dão sentido a tudo. Obrigado meus amores.

Shall we begin?

## Sumário

1	Introdução .....	1
1.1	O Vírus do Mosaico do Tabaco .....	1
1.2	Proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco.....	24
1.3	Mapeamento de epítomos e Spot Synthesis .....	31
1.4	Alta pressão hidrostática .....	50
1.4.1	Equipamento de alta pressão hidrostática.....	53
1.4.2	Aplicação da alta pressão no desenvolvimento de vacinas.....	56
1.5	Bioinformática.....	60
2	Justificativa .....	76
3	Objetivos .....	77
3.1	Objetivos específicos.....	77
4	Método.....	78
4.1	Vírus do mosaico do tabaco. ....	78
4.1.1	Seqüenciamento do TMV - Extração de RNA viral.....	78
4.1.2	Reação de RT-PCR para TMV .....	78
4.2	Síntese de peptídeos em membrana – Spot synthesis .....	80

4.2.1	Ensaio imunoenzimático.....	84
4.2.2	Revelação Fosfatase Alcalina .....	84
4.2.3	Regeneração da membrana.....	85
4.2.4	Obtenção dos soros com anticorpos. ....	86
4.2.5	Testes ELISA dos soros obtidos .....	86
4.3	Equipamento de alta pressão.....	90
4.3.1	Preparação da suspensão viral para os ensaios com alta pressão e temperatura .....	90
4.4	Bioinformática.....	91
5	Resultados.....	94
5.1	Experimentos <i>in silicio</i> .....	94
5.1.1	Área de superfície acessível da TMVcp .....	94
5.1.2	Ubiquitinação da TMVcp .....	101
5.1.3	Antigenicidade e Hidrofobicidade da TMVcp.....	102
5.2	Imunoinformática.....	106
5.2.1	MHC classe I .....	106
5.2.2	Afinidade de ligação ao transportador TAP .....	109

5.2.3	Previsão de afinidade de ligação para MHC classe I .....	111
5.2.4	Previsão de afinidade de ligação a MHC classe II .....	115
5.2.5	Previsão de epítopos lineares em células B .....	118
5.3	Resultados experimentais .....	121
5.3.1	ELISA .....	121
5.4	Mapeamento de epítopos .....	123
5.5	Mapeamento dos tratamentos da TMVcp.....	125
6	Discussão .....	133
7	Conclusões .....	154
8	Bibliografia .....	155
8.1	Parecer do comitê de ética.....	185
8.2	Tabela de resultados combinados.....	186
8.1	Artigos .....	187
8.1.1	Epitope mapping of tobacco mosaic vírus capsid protein: prediction and experimental data from spot synthesis .....	187
8.1.2	The effect of High Hydrostatic Pressure on Avian Metapneumovírus Immunogenicity .....	231

## Índice de Figuras

Figura 1: Doença do mosaico do tabaco em *Nicotiana rustica*. A: Planta sadia. B: Planta infectada pelo TMV (7). Observa-se à esquerda desenvolvimento normal com estatura e folhas maiores na condição sadia, quando da infecção por TMV verifica-se neste exemplo diminuição de estatura, comprometimento das funções de crescimento e obtenção de energia. .... 12

Figura 2: Descrição da estratégia de expressão do genoma do vírus do mosaico do tabaco (TMV). As setas vermelhas indicam tradução dependente do hospedeiro; setas azuis indicam a transcrição de um RNA (-) modelo. Caixas preenchidas são quadros abertos de leitura (ORFs), os quais são mostrados em diferentes cores. Caixas tracejadas indicam as proteínas. A região 5' terminal do RNA viral e os mRNAs têm uma estrutura cap com trifosfato de 7-metilguanossina (m7Gppp). A ORF mais próxima da extremidade 5' do RNA genômico é traduzida para uma proteína de 126 kDa. Um stop codon "leaky" permite leituras diferenciais, mas são pouco frequentes (1/10 vezes) e geram uma proteína com 183 kDa. Estas duas proteínas, juntamente com as proteínas do hospedeiro constituem a RNA polimerase RNA dependente RdRp. A enzima então transcreve um RNA polaridade negativa a partir de RNA genômico (+). A RdRp transcreve também o RNA (-) em RNA (+) (59). .... 13

Figura 3: Modelo de replicação do vírus do mosaico do tabaco. Brevemente, após a entrada em seu hospedeiro através de inoculação mecânica, o TMV desnuda-se para liberar o RNA viral. Em seguida, o genoma viral começará a se replicar, produzindo múltiplos mRNAs. Os mRNAs gerados codificam para várias proteínas, incluindo a proteína do capsídeo e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), bem como a proteína de movimento. Depois de as proteínas e do genoma do TMV serem sintetizados, eles são agrupados espontaneamente em vírions completos em um processo altamente organizado. O RNA do vírus é de polaridade positiva, ou "sentido +", e serve diretamente como um RNA mensageiro (mRNA) que é traduzido utilizando ribossomos do hospedeiro. A tradução das proteínas associadas à replicase (126 kDa e 183kDa) começa logo após a infecção. Logo que estas proteínas são sintetizadas, os complexos formados pela replicase e proteínas relacionadas associam-se com a extremidade 3' do RNA viral para a produção de um molde em polaridade negativa. Este molde de RNA é o usado para a produção de ambos RNA genômico e subgenômicos. Os sgRNAs são traduzidas pelos ribossomos hospedeiro para produzir a proteína de movimento (MP) (30 kDa) e a proteína do capsídeo (CP) (17,5 kDa). A proteína de revestimento, em seguida, interage com o RNA recém-sintetizado para a montagem de virions da prole. Estas partículas virais são muito estáveis e, em algum ponto quando as células são lisadas são lançados para infectar novas plantas. Alternativamente, o RNA genômico é envolto em proteínas de movimento, e esse complexo pode infectar células adjacentes. .... 15

Figura 4: Modelo de replicação e degradação. À esquerda a representação dos sistemas de processamento de bactérias e fungos. À direita a representação

da replicação e processamento do vírus do mosaico do tabaco (78). A Ub é uma proteína que é altamente conservada em todo o reino eucariótico. A fixação de Ub em proteínas celulares (referido como ubiquitinação) é envolvida na regulação de muitas vias de sinalização, e também desempenha um papel importante na homeostase da proteína e da célula. Três fases distintas no processo de ubiquitinação são controladas por três classes de enzimas: i) ativação de Ub através da enzima de ativação da ubiquitina (E1), durante o qual Ub é transferida para o E1; ii) transferência de Ub da enzima E1 para uma enzima de conjugação da ubiquitina (E2), e iii) a transferência de Ub da enzima E2 para a proteína substrato, um processo realizado pela ligase E3, que coordena ubiquitinação, fornecendo uma plataforma de ligação de enzimas específicas e E2 substratos. A proteína Ub liga-se à proteína alvo por meio de uma ligação entre o seu peptídeo C-terminal Gli e um aminoácido da proteína substrato alvo, na maioria dos casos, uma lisina. Esta modificação (mono-ubiquitinação) pode, então, ser estendida através de ligação de outras moléculas Ub..... 19

Figura 5: modelo de transporte célula a célula via proteína de movimento do vírus do mosaico do tabaco. Um modelo de difusão célula-a-célula do vírus do mosaico do tabaco. Infecção inicial do RNA viral (RNAv) permite a síntese de replicase, que por sua vez gera RNAs de polaridade positiva e negativa (RNAv e RNAsg). Ocorre também a tradução da proteína de movimento (TMVmp) e da proteína do capsídeo (TMVcp). Em resposta à infecção, ocorre acúmulo de calose na região de parede em torno do plasmodesmata (Pd) restringindo a fenda citoplasmática. MP, associada à membrana do retículo (ER) funciona como uma jangada proteica para o RNAv com seus domínios citoplasmáticos, formando um complexo de replicação (VRC) que também pode conter a replicase. O tráfego intracelular do VRC para o ER cortical ocorre quer por difusão nos lipídios ou por tráfego vesicular. O VRC difunde através do Pd para células adjacentes por desmotubulos contínuos dependente do gradiente de concentração entre uma célula infectada e as adjacentes não infectadas (81)..... 21

Figura 6: Cristalografia da proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco. Estrutura marcada pelo software PyMol (academic version, filtros para bolsões) ressaltando as regiões com cavidades (esferas em cores para diferenciação) e também a orientação da sequência da proteína. Estrutura utilizada 3J06.pdb já depositada no banco de dados de proteínas (PDB). ..... 25

Figura 7: Representação esquemática da orientação e reconhecimento antigênico da proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco. Modelo esquemático de sub-unidades proteicas do TMV em forma monomérica e na partícula viral. Neotopos são encontrados nas superfícies A' e E', metatopos são encontrados nas superfícies A, A', E e E', e criptotopos são encontrados nas superfícies B, C e D. Os tipos de epitopos presentes na superfície F não foram definidos. A extremidade E0 do vírion contém a extremidade 5' do RNA (87). ..... 29

Figura 8: Preparação das membranas para síntese paralela de peptídeos. Passo de fixação dos peptídeos à membrana: (I) Membrana de celulose não

tratada, com os grupos hidroxila reativos disponíveis (OH). (II) grupos hidroxila foram esterificados com os grupos carboxílicos com alanina protegida por Fmoc. Após desproteção de Fmoc, de uma camada de  $\beta$ -alanina (A') ligada à celulose. Os grupos amino livres são então corados com BPB, como está simbolizado pela cor azul da membrana de celulose e dos grupos NH<sub>2</sub>. (III) em pontos distintos, uma segunda alanina protegida com Fmoc é depositada sobre a celulose, definindo as zonas para a síntese peptídica. Seguindo a acetilação de todos os grupos amino livres, desproteção Fmoc e coloração com BPB, apenas os pontos onde a segunda alanina teve sucesso na incorporação apresentam coloração azul. Os grupos amino acetilados são mostrados em laranja (185). ..... 45

Figura 9: Preparação das membranas para síntese paralela de peptídeos. Passo síntese controlada dos peptídeos em membrana: (IV) O ligante na membrana, composto por duas alaninas é representado como "L" dentro de uma caixa de cor amarela. (V) em cada local, o próximo aminoácido necessário, protegido por Fmoc, é fornecido, como simbolizado na caixa de cor verde com o código de uma letra para os aminoácidos. A estrela refere-se os grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos. As áreas cinzentas indicam que ponto as soluções dos ácidos aminados são utilizados. (VI) A desproteção de Fmoc com piperidina liberta grupos amino para o acoplamento do aminoácido seguinte. A cor cinza indica que a membrana é tratada com solventes. (VII) Os grupos amino livres são corados com BPB (indicada pelos pontos azuis). (VIII) A membrana de celulose é seca (indicado pela cor branca) e as manchas são quantificadas. (185). ..... 46

Figura 10: Representação esquemática dos peptídeos sintetizados fixos à membrana e em processo de identificação imunológica seguida de revelação mediada por anticorpos conjugados com fosfatase alcalina e posterior quantificação digital realizados neste trabalho. .... 47

Figura 11: (A) Foto do gerador de pressão. (B) Foto da câmara de pressão onde são colocadas as cubetas para realização dos experimentos, mostrando as janelas por onde passam os feixes de luz para realização das medidas espectroscópicas e as mangueiras onde é conectado o sistema refrigerador. (C) Foto das cubetas de quartzo, uma dividida ao meio utilizada para os experimentos de microscopia sob alta pressão, sem ser selada (lado esquerdo) e a outra selada com tubo plástico de polietileno usada nos demais experimentos (lado direito). (D) Foto do fluorímetro e do computador, responsável por executar uma série de funções automatizadas – Imagens cedidas pelo Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP. .... 52

Figura 12: representação esquemática das alterações em entalpia e volume da proteína quando tratamentos físico-químicos são aplicados à estrutura (215). 55

Figura 13 Alterações induzidas por pressão na estrutura da proteína do capsídeo do Cowpea Mosaic Vírus (CPMV), evidenciando exposição e oclusão de aminoácidos após o tratamento com 330 MPa. A: Alterações induzidas por

pressão induzidas nas cavidades do CpMV. Esta figura mostra a cópia reorientada com volumes das cavidades mais próximas aos valores médios obtidos, AP – Pressão Atmosférica, HP – Alta Pressão. B: A variação do volume da cavidade entre AP e HP como uma função do volume médio de HP. Números da curva representam o número da cavidade e do volume médio da cavidade em AP (em itálico, entre parênteses). C: Alterações no empacotamento do cristal, devido à alta pressão. Cb: domínio de interação, Cc: zona de interação com o domínio C (222)..... 60

Figura 14: Mecanismos de processamento, apresentação e comunicação celular para interpretação via MHC classe I de antígenos. O processamento antígenos começa já com a transcrição e tradução. Muitas proteínas são feitas de forma imperfeita, designadas por produtos defeituosos. De uma maneira semelhante a proteínas endógenas funcionais, são degradadas pelo proteassomo no núcleo e no citoplasma. O proteassomo pode, assim, gerar novos antígenos não codificados geneticamente. Os peptídeos resultantes são substâncias para aminopeptidases citosólicas, como a peptidase tripeptidil II (TPPII), que cortar e destrói a maioria dos peptídeos. Uma pequena fração de peptídeos pode escapar à destruição e portanto a translocação para o lúmen do retículo endoplasmático (ER) através do transportador associado com a apresentação de antígenos (TAP), que faz parte do complexo de carregamento de peptídeos (PLC; que, portanto, contém moléculas MHC classe I, ERp57, calreticulina e tapasina). Peptídeos podem então se ligar a moléculas MHC classe I diretamente ou podem exigir mais cortes aminopeptidases associadas com processamento de antígenos (ERAAP) no ER antes de serem considerados adequados para o MHC classe I, dentro ou fora do PLC. Os complexos peptídeo-MHC de classe I são, em seguida, liberados do PLC e do ER e são transportadas para a membrana para a apresentação a células T CD8 + (163)..... 62

Figura 15: Mecanismos de processamento, apresentação e comunicação celular para interpretação via MHC classe II de antígenos. As moléculas de MHC de classe II são constituídas cadeias por  $\alpha$  e  $\beta$  montadas no retículo endoplasmático (ER) e formam um complexo com a cadeia invariante (Ii). Proteínas endocitadas são degradadas por proteases residentes no processo de apresentação via MHC II. O fragmento peptídico Ii associado à molécula de MHC classe II (CLIP) permanece na cavidade de ligação ao peptídeo do MHC e é trocado por um peptídeo antigênico, com a ajuda da molécula auxiliar específica do alelo envolvido (como H2-M, em camundongos). Moléculas de MHC de classe II são então transportados para a membrana para apresentar os peptídeos antigênicos para células T CD4 +. APC, células apresentadoras de antígenos, TCR, receptor de célula T (163). ..... 64

Figura 16: Fluxograma para predição de informações com base na sequência de uma dada proteína. .... 70

Figura 17: Área de superfície acessível para a TMVcp. Sequência completa da proteína individualizada por aminoácidos com os respectivos scores de



exposição (barras) e características (verde – aminoácidos polares; vermelho – aminoácidos ácidos; azul – aminoácidos básicos; cinza – aminoácidos hidrofóbicos)..... 95

Figura 18 Resultados do algoritmo de previsão para área de superfície acessível. Disposição dos aminoácidos da sequência da TMVcp (1 a 61) em termos de exposição, polaridade e previsão de exposição. .... 97

Figura 19: Resultados do algoritmo de previsão para área de superfície acessível. Disposição dos aminoácidos da sequência da TMVcp (62 a 122) em termos de exposição, polaridade e previsão de exposição. .... 99

Figura 20: Resultados do algoritmo de previsão para área de superfície acessível. Disposição dos aminoácidos da sequência da TMVcp (123 a 157) em termos de exposição, polaridade e previsão de exposição. .... 99

Figura 21: Resíduos envolvidos em interações na superfície da proteína TMVcp. Resultados do algoritmo de predição SPPIDER II. Primeira linha: numeração dos resíduos, segunda linha: sequência da TMVcp, terceira linha: probabilidade média para cada resíduo ser um sítio de interação, quarta linha: número de redes neurais com resultado positivo para o sítio de interação..... 100

Figura 22: Esquerda: Área de superfície acessível mapeada na estrutura cristalográfica 3J06 do PDB para a TMVcp, resíduos marcados em vermelho mapeiam para pontos de interação. site <http://sppider.cchmc.org/>. Direita: Representação classificativa da conservação na estrutura 3J06 após alinhamento múltiplo e análise por homologias. As cores representam graus de conservação, azul escuro: maior variação e roxo escuro: maior conservação encontrada pelos alinhamentos gerados pelo site <http://consurf.tau.ac.il> ..... 100

Figura 23: Previsão de ubiquitinação pelo método probabilístico bayesiano. .... 101

Figura 24: Previsão de ubiquitinação de lisinas pelo algoritmo CKSAAP. 102

Figura 25: Hidrofobicidade e antigenicidade (Kyte-Doolittle acima e Hopp-Woods abaixo) para a TMVcp. .... 103

Figura 26: Representação esquemática da TMVcp gerada pelo programa CLC Workbench alinhando os algoritmos de previsão de hidrofobicidade (kyte-doolittle), antigenicidade (Hopp-Woods), hidrofobicidade (Kolaskar-Tongaonkar), probabilidade de exposição na superfície (Surface probability) e flexibilidade de cadeia (Chain flexibility) com a estrutura secundária e polaridade dos aminoácidos. .... 104

Figura 27: Previsão de clivagens na TMVcp pelo proteassomo segundo o algoritmo PAProc. .... 107

Figura 28: Previsão de clivagens na TMVcp pelo proteassomo segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB. ....	108
Figura 29: Previsão de afinidades de ligação ao transportador TAP para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB. ....	110
Figura 30: Previsão de afinidades de ligação ao transportador TAP para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo TAP hunter. ....	110
Figura 31: Previsão de afinidades de ligação ao transportador TAP para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo TAP Pred. ....	111
Figura 32: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe I do alelo Balb/C Dd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB. ....	112
Figura 33: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe I do alelo Balb/C Kd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB. ....	113
Figura 34: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe I do alelo Balb/C Ld para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB. ....	113
Figura 35: Resultados combinados (clivagem por proteassomo, afinidade por TAP, afinidade por MHC) para os alelos disponibilizados pelo site do IEDB em contraste com o gráfico de intensidade de sinal do mapeamento da forma nativa no <i>inset</i> . ....	115
Figura 36: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe II do alelo Balb/C IAd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB. ....	116
Figura 37 Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe II do alelo Balb/C IEd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB. ....	117
Figura 38: Previsão de clivagens para as enzimas endossomais de processamento MHC classe II com sítios de clivagem mapeados disponibilizadas no servidor de previsão ExPaSy testadas para a TMVcp. ....	118
Figura 39: Previsão de reconhecimento e afinidades de epitopos para células B para a sequencia da TMVcp. ....	119
Figura 40: Previsões de epítopos descontínuos via BepiPRED e IEDB em células B para o arquivo 3J06 do Protein Data Bank. Epítopos previstos pelo BepiPRED na TMVcp são indicados em cores (azul: probabilidade de ligação baixa; vermelha: alta probabilidade de ligação). ....	120
Figura 41: Resultado para testes de diluição seriada de anticorpos em ELISA para a TMVcp nas formas nativa e pós tratamentos. ....	122
Figura 42: Resultado para testes de sensibilidade cruzada de anticorpos em ELISA para a TMVcp nas formas nativa e pós tratamentos. ....	123

Figura 43: Esquema de localizações peptídicas na membrana. Os pentadecaptides correspondentes são apresentados na Figura 45 .....	124
Figura 44: Reatividade dos peptídeos sintetizados em membrana contra de soro de camundongos imunizados com parvovírus suíno (A, controle negativo), em comparação com o soro de camundongos imunizados com TMV nativo (B). Os peptídeos foram geradas a partir da sequência TMVcp em membranas de celulose. Após a incubação com soro, as membranas foram scaneadas e digitalizadas para quantificação dos spots. ....	125
Figura 45: Resultados do mapeamento de epítomos, com base na Figura 43, expressa como a intensidade local em AU (unidades arbitrárias). O comprimento das colunas reflete o grau de imunorreatividade (intensidade local, tal como quantificado com TotalLab Software Quant e corrigido para o controle). Os pentadecapeptides correspondentes são listados à esquerda e à direita. A aminoácidos sublinhados na direita indicam epítomos identificados em relatórios anteriores (30, 87, 286). ....	126
Figura 46: Membranas tratadas com os soros dos camundongos imunizados com os tratamentos da TMVcp listados à esquerda de cada membrana. ....	127
Figura 47: Comparação do mapeamento da forma nativa <i>versus</i> o tratamento com alta pressão .....	127
Figura 48: Comparação do mapeamento da forma nativa <i>versus</i> o tratamento com uréia 4 M .....	129
Figura 49: Comparação do mapeamento da forma nativa <i>versus</i> o tratamento com alta pressão e uréia 1 M .....	130
Figura 50: Comparação do mapeamento da forma nativa <i>versus</i> o tratamento com alta pressão e baixa temperatura .....	131

## Resumo

O presente trabalho visou mapear os epítomos de preparações do Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV), modelo experimental importante, nas formas nativas e inativadas por alta pressão hidrostática (HHP) que corresponde a um método que promove dissociação de proteínas oligoméricas e estruturas supramoleculares, além de combinações com variações de temperatura e também na presença de agentes desnaturantes. Foi feita a identificação dos epítomos pela técnica de *spot synthesis* de peptídeo em membrana de celulose da proteína do capsídeo do TMV (TMVcp), a técnica consiste em arranjos planejados de peptídeos relacionados à TMVcp em quatro condições experimentais – HHP, ureia, HHP na presença de ureia e HHP em baixa temperatura. Soros de camundongos Balb/C previamente inoculados com a solução viral em sua forma nativa e também nos tratamentos experimentais separadamente foram utilizados e revelados através de reação enzimática derivada da interação entre anticorpos secundários marcados com fosfatase alcalina e anticorpos murinos dos soros testados. Os resultados foram digitalizados, qualificados e quantificados. Em outra abordagem, a sequência obtida pelo sequenciamento do vírus cultivado em laboratório foi submetida a análises por algoritmos *in silício* – bioquímicos e imunológicos – para previsão de áreas de interação na superfície da proteína e também características antigênicas de produção de epítomos, relacionados exclusivamente ao modelo animal utilizado. A forma nativa do vírus elicitou resposta imunológica similar à prevista pelos algoritmos, com diferenças importantes entre os relatos da literatura e nossos resultados. Nas condições de HHP e combinações experimentais as

previsões *in silicio* discordaram dos resultados obtidos diametralmente em alguns casos. O conjunto de informações geradas *in silicio* foram mapeadas na cristalografia da TMVcp nativa e em combinação com dados obtidos experimentalmente verificou-se extensa alteração no perfil de epítomos expostos na superfície desta proteína, de acordo com os tratamentos físico-químicos empregados.

## Summary

The present study aimed to map epitopes from different treatments of Tobacco Mosaic Virus (TMV), an important experimental model in its native form and when inactivated by high hydrostatic pressure (HHP), a method that promotes dissociation of molecular assemblies and oligomeric proteins, along with combinations of temperature variations and also in the presence of denaturing agents. It was done by identification of epitopes technique peptide spot synthesis on cellulose membrane capsid protein of TMV (TMVcp), the technique involves planned arrangements of peptides related in four experimental conditions TMVcp - HHP, urea, HHP in the presence urea and HHP at low temperature. Sera from mice previously inoculated BalbC with the viral solution in its native form as well as in experimental treatments were used separately exposed and developed through enzyme reaction deriving from the interaction between labeled secondary antibodies and antibodies to alkaline phosphatase murine sera tested. The results were scanned, quantified and qualified. In another approach, the sequence obtained by sequencing of viruses grown in the laboratory was subjected to analysis by algorithms in silico - biochemical and immunological - to predict areas of interaction on the protein surface and also antigenic characteristics of producing epitopes exclusively related to the model animal used. The native form of the virus elicited immune responses similar to those provided by the algorithms, plus important differences between the literature and our results were found. Under conditions of HHP and combinations experimental silicon predictions differed in the results diametrically in some cases. The set of information generated in silicon

have been mapped in crystallography of native TMVcp and in combination with data obtained experimentally it was found extensive changes in the profile of the surface exposed epitopes of this protein, according to the physical-chemical treatments employed.

# 1 Introdução

## 1.1 O Vírus do Mosaico do Tabaco

Durante os últimos anos, o vírus do mosaico do tabaco (TMV) foi submetido ao olhar de virologistas vegetais e historiadores da ciência. Com a comemoração de 100 anos da virologia, e em particular, da elucidação por Martinus Beijerinck que o TMV era um *contagium vivum fluidum*, ou seja, uma substância que mesmo filtrada causava infecção e podia mover através de um meio de agar. Esta propriedade, em uma comparação direta com as bactérias, permaneceu (*contagium vivum fixum*) (1, 2). Deste ponto em diante a ciência da virologia foi criada, ampliando o espectro de organismos causadores de doenças. As características gerais do vírus foram confirmadas pelo trabalho de Loeffler e Frosch em Foot and Mouth Disease Vírus (FMDV) (3) juntamente com a descoberta pelo canadense Félix d'Herelle (4) que as bactérias poderiam ser lisadas por pequenos vírus, cunhando o termo bacteriófago viria então a confirmação deste novo nicho da biologia.

Na primeira metade do século XX o TMV foi eleito vírus modelo para estudos básicos em biologia vegetal, virologia (incluindo virologia médica), biologia estrutural, bioquímica, genética, imunologia e muitos outros campos da ciência que se beneficiaram das características elegantemente simples deste organismo. Estas histórias foram recentemente discutidas e contextualizadas em diversas revisões da literatura (5-8). Hoje, o TMV mantém seu lugar como uma ferramenta



robusta para a pesquisa em muitos campos importantes da ciência e também do ensino, bem como um modelo experimental e didático para os cientistas e historiadores.

Parte da compreensão do sucesso de TMV como objeto de estudo depende da avaliação das práticas agrícolas e em particular do tabaco. A partir de meados do século XIX até o início do século XX, além do mercado potencial à época para expansão comercial do fumo, o tabaco ganhava importância como moeda de troca e também como ferramenta de pesquisa. Os estudos feitos por Beijerinck, e os dados preliminares, obtidos anteriormente por Mayer e Ivanowski, além de pioneiros estabeleceram informações importantes para a ciência virológica que se formava.

Antes de descrever o estado atual de desenvolvimento do conhecimento em TMV é interessante observar como este vírus tornou-se uma valiosa ferramenta para a biologia. No nível mais básico, o objetivo dos cientistas da época não era estudar o TMV, mas obter uma compreensão fundamental da causa da doença do mosaico do tabaco, prejudicial à produção de tabaco naquele momento com perdas expressivas em termos de produção, como veremos adiante. O trabalho com TMV era pragmático: a doença do mosaico reduz a produção e qualidade do tabaco, portanto, um corpo de conhecimento deveria ser construído para solução do problema. A doença do mosaico era aparentemente familiar aos produtores de tabaco na Holanda, antes mesmo do primeiro relatório

de um aluno de Wageningen em 1857 (9). Adolph Mayer confirmou esta observação trinta anos depois:

“Nas regiões dos Países Baixos, onde o cultivo de tabaco floresce, isto é nas províncias de Gelderland e Utrecht, não tem prevalecido durante muitos anos uma doença da planta cultivada, a qual parece ser muito importante para chamar a atenção das ciências agrícolas, porque o dano causado por esta doença é frequentemente muito grande e eu mesmo sei casos em que, quando manifestada a doença, o cultivo do tabaco era abandonado inteiramente em um determinado lugar”

Nesse manuscrito, Mayer usou a identificação de bactérias com a apresentação formal dos postulados de Koch em 1884 (10) como um modelo para sua pesquisa. Avanço importante dado por Mayer para o desenvolvimento de virologia foi a descoberta "que o sumo de plantas doentes obtidos por trituração produzia uma determinada substância infecciosa para plantas saudáveis". Mayer também escreveu uma nota curiosa a respeito de seus controles negativos: "Seiva de plantas saudáveis não produzem a doença, como já comprovado experimentalmente, embora para alguns pode parecer supérfluo, tentei isso". Embora Mayer tenha falhado em sua tentativa de estabelecer a etiologia, tendo concluído que "a doença do mosaico do tabaco é uma doença bacteriana", o seu relatório pode ser considerado monumental em um campo totalmente novo de pensamento e de investigação. Mayer artificialmente transmitiu, pela primeira vez, um agente causal incultivável e invisível ao microscópio. Isso durante uma época

em que Pasteur objetivava solucionar um problema semelhante com a raiva, e avançou pouco na direção da causa destas doenças peculiares como fez Mayer. Ivanowski também descreveu a doença do tabaco (11), em paralelo com a descrição publicada por Mayer, mas concluiu que o agente, capaz de passar através de filtros de porcelana era, provavelmente, uma toxina bacteriana. Portanto, não até o relato de Beijerinck em 1898 ficou claro que o organismo era menor do que bactérias. Em outras palavras, Beijerinck determinou que poderia isolar o agente a partir de um filtrado de caldo infectado ou por difusão em agar, e em seguida utilizado para infectar plantas saudáveis, reproduzindo a doença do mosaico do tabaco (6-8, 11). No início do século XX, a agricultura era a pedra angular da vida americana, com mais de 40% das pessoas vivendo ou trabalhando em fazendas (12). Melhorias em todos os aspectos da agricultura derivou de uma intenção pragmática em reforçar a economia dos Estados Unidos, que incluía os mercados locais e internacionais, transportes, mecanização, bem como a saúde, educação e bem-estar dos seus cidadãos. À época, o centro político e filosófico do país girava em torno da agricultura. Esta inclinação política do país em promover práticas inovadoras agrícolas foi, em grande parte, resultado da *Land-Grant Morrill Act* (1862), somada a *Agricultural Experiment Station Act* (1877), e a criação do *United States Department of Agriculture* (USDA) em 1862, dispositivos legais para a manutenção dos objetivos citados. O *Homestead Act* (1862) e a conclusão da ferrovia transcontinental (1869) foram os passos finais para garantir a expansão da agricultura e de novos assentamentos em todos os

Estados Unidos, garantindo jurisprudência, infraestrutura e, portanto, segurança à economia dependente da produção agrícola.

Como a teoria microbiana foi aceita à época e a identificação de fungos e bactérias como agentes de doenças de plantas tornou-se lugar comum, a fitopatologia também ocupou posição de destaque na melhoria das culturas e prevenção de doenças no final do século XIX. As estações experimentais agrícolas e faculdades direcionadas à pesquisa científica para a melhoria das culturas, e promoção da saúde e o bem-estar social de ambos os agricultores e os habitantes das cidades proliferaram. Embora o USDA tenha feito essa transição em direção ao aprofundamento do conhecimento de causa para a melhoria da resistência e da cultura, o entendimento de patógenos estava ainda em sua infância. Muitas doenças não eram conhecidas, seus ciclos replicativos complexos ainda obscuros e práticas ou técnicas de prevenção, por consequência, geralmente ineficazes.

Para entender o porquê TMV tornou-se um sistema modelo, parece lógico começar com uma visão geral do tabaco. Tabaco foi uma colheita altamente rentável para os Estados Unidos por quase três séculos, impulsionando o desenvolvimento social, econômico e político, especialmente em Maryland e Virginia (13-15), e ainda hoje no Kentucky e Carolina do Norte. Em Maryland, o tabaco tornou-se moeda com efeito legal (*legal tender*) em 1732 (à taxa de 1 centavo por unidade de peso)” (16).

O tabaco foi encontrado em toda a América e nas Índias Ocidentais (arquipélago das Antilhas). Quando os exploradores espanhóis chegaram no que é hoje o Yucatan, no México, no início do século XVI, as populações locais cultivavam "a planta estranha [do tabaco] com muito cuidado e habilidade, e a usam tanto para fumo como rapé."(17, 18)

Em 1600, o tabaco fora introduzido na Europa, Índia, Japão, Rússia, possivelmente China, e na costa oeste da África. Como os europeus se instalaram na América, o cultivo de tabaco foi relatado em Jamestown por 1612. As exportações aumentaram rapidamente, relacionada à também crescente demanda e à dependência que produz nas pessoas que fazem uso da planta. Com isto, a *Nicotiana tabacum* desalojara *N. rustica* como principal espécie cultivada (15, 18).

De 1894-1898, os Estados Unidos exportaram 280 milhões de quilos de tabaco em folha, a cada ano, principalmente para a Europa, com um valor de aproximadamente US \$ 24 milhões (18-20). Em 1919, cerca de 50% da safra mundial foi produzida por agricultores norte-americanos, mantidos pelo modo de produção escravo dos estados sulistas. Por exemplo, mesmo com as intensas práticas de colheita de cultivo e pesados, 457 milhões de quilos de tabaco foram produzidos no Kentucky em 1919 (21). O valor hipotético e potencial de todas as culturas agrícolas dos EUA em 1919 era US \$ 16 bilhões, destes, a parcela atribuída ao tabaco respondia por 542,5 milhões de dólares (14), esclarecendo o interesse no avanço de pesquisas neste campo. O Tabaco foi também uma importante fonte de receita para o governo dos EUA. Com 8 quilos de tabaco

consumido per capita nos Estados Unidos em 1919 e 23 bilhões de cigarros disponíveis para o consumo interno naquele momento (21), o tabaco tornou-se uma parte arraigada da cultura americana e por consequência, do mundo, observando a inserção do incentivo ao hábito em meios de divulgação associando-o a um *status* perigoso. O consumo de produtos de tabaco *per capita*, para maiores de 15 anos em 1962, foi de quase 12 quilos. Hoje, o consumo per capita é de 4 quilos, para os maiores de 18 anos (14, 22). Graças à crescente dependência do mercado americano na produção agrícola do tabaco, agentes que comprometessem os números citados eram do mais alto interesse. Em 1902, Woods do USDA escreveu um relatório que confirmou as experiências de Mayer e Beijerinck. Ele observou que a doença do mosaico do tabaco "ocorre mais ou menos em todas as áreas de tabaco do país e é muito comum na Europa". A doença não é de fácil controle e, no final de 1940, o TMV nos Estados Unidos foi responsabilizado por uma perda média anual de 40.000.000 quilos de tabaco, correspondente a 2-3% da safra. Essa era uma preocupação econômica significativa, por exemplo, no Kentucky o período de 1939 a 1959, o tabaco respondeu por um terço dos lucros provenientes da agricultura, e os produtores dependiam de soluções práticas para controlar o TMV (14, 18, 23, 24). Contemporâneo a esse fato, o TMV estabeleceu-se como um vírus economicamente importante também (5, 15, 25-32).

Sistemas-modelo foram e continuarão a ser uma chave na solução de problemas em muitos em ciência. Por definição, os modelos são a força motriz para etapas independentes de descoberta, desenvolvimento e invenção, sejam

eles matemáticos em essência (33-36), ou biológicos propriamente ditos, e tem função na desconstrução dos problemas em partes controláveis e reprodutíveis, como propunha Descartes em seu “Discurso do Método”. Embora muitos organismos sejam vistos como sistemas-modelo, poucos atingem o padrão de qualidade estabelecido pelo TMV. Alguns organismos bem estabelecidos como modelos (tais como camundongos, *Drosophila melanogaster*, fungos e leveduras, além de *Caenorhabditis elegans*) são essenciais para estudos que ampliem a nossa compreensão de biologia celular e processos de doença, mas resultados de impacto, similares aos atingidos com o modelo do TMV, somente foram atingidos muito tempo depois, comparativamente. Biólogos vegetais têm contribuído para esse esforço grandemente com a geração de seqüências genômicas de *Arabidopsis* e do arroz, abrindo uma nova era para a genética e a biologia integrativa e permitindo a comparação molecular entre animais, plantas, microrganismos e vírus (37-40), gerando, por exemplo, teorias importantes de evolução molecular e de cooperação genética (*Muellers Ratchet*, *Red Queen Hypothesis*, *Black Queen Hypothesis*) muito importante e com grandes implicações atualmente (tratamentos contra HIV dependentes do monitoramento contínuo da evolução intrahospedeiro das espécies virais resistentes). Em fitopatologia, vários organismos-modelo foram definidos e extensivamente estudados, principalmente o vírus do mosaico do tabaco, o ponto central desta tese. O aspecto primordial na definição de um sistema modelo é pragmático e indaga sobre a utilidade/aplicabilidade. Como sistema experimental, TMV e o tabaco ganharam sua reputação por trabalhos em muitas áreas da biologia,

incluindo fitopatologia. O TMV além de protótipo para discussões sobre a conceituação de Vírus foi e é uma importante ferramenta (31, 32, 41-48) de estudo e compreensão (por analogia ou diretamente) dos mecanismos gerais de interação patógeno e hospedeiro, tais como interações macromoleculares em uma célula normal, automontagem de capsídeos, transmissão célula a célula de informações genéticas, regulação celular entre tantos outros aspectos que esta disciplina atualmente estuda.

Do ponto de vista prático, algumas das propriedades de TMV que o tornaram um sistema modelo são: acumulo rápido com títulos elevados em plantas infectadas, não é transmitida por insetos, fungos, ou nemátodeos, mas é facilmente transmitido por fricção-inoculação, e os sintomas causados pelo TMV são de fácil identificação em plantas (figura 1). O vírus também é estável durante anos ou mesmo décadas em condições ideais, decorrencia direta da estrutura e organização das informações que este organismo codifica. Outra consideração importante é a gama de hospedeiros capazes de replicar este vírus. O TMV infecta facilmente o tabaco e outras plantas da família das solanáceas além de mais de 200 outras espécies, mais uma vez tornando-se muito adaptável ao laboratório, estufa, e experimentação de campo. Muitos dos trabalhos seminais associados com TMV residiam nos campos da química e da física, celebrados e discutidos em outras revisões tratam da importância deste modelo (29, 30, 32, 49-54). Alguns dos avanços na tecnologia e / ou conceitos sobre vírus foram possíveis porque este em particular mostrou-se receptivo aos rigores do ambiente laboratorial. Em essência, descreveu-se que muitas estirpes de vírus do mosaico do tabaco



constituem material particularmente favorável para a análise, devido à sua natureza química relativamente simples e facilidade de purificação (55-58).

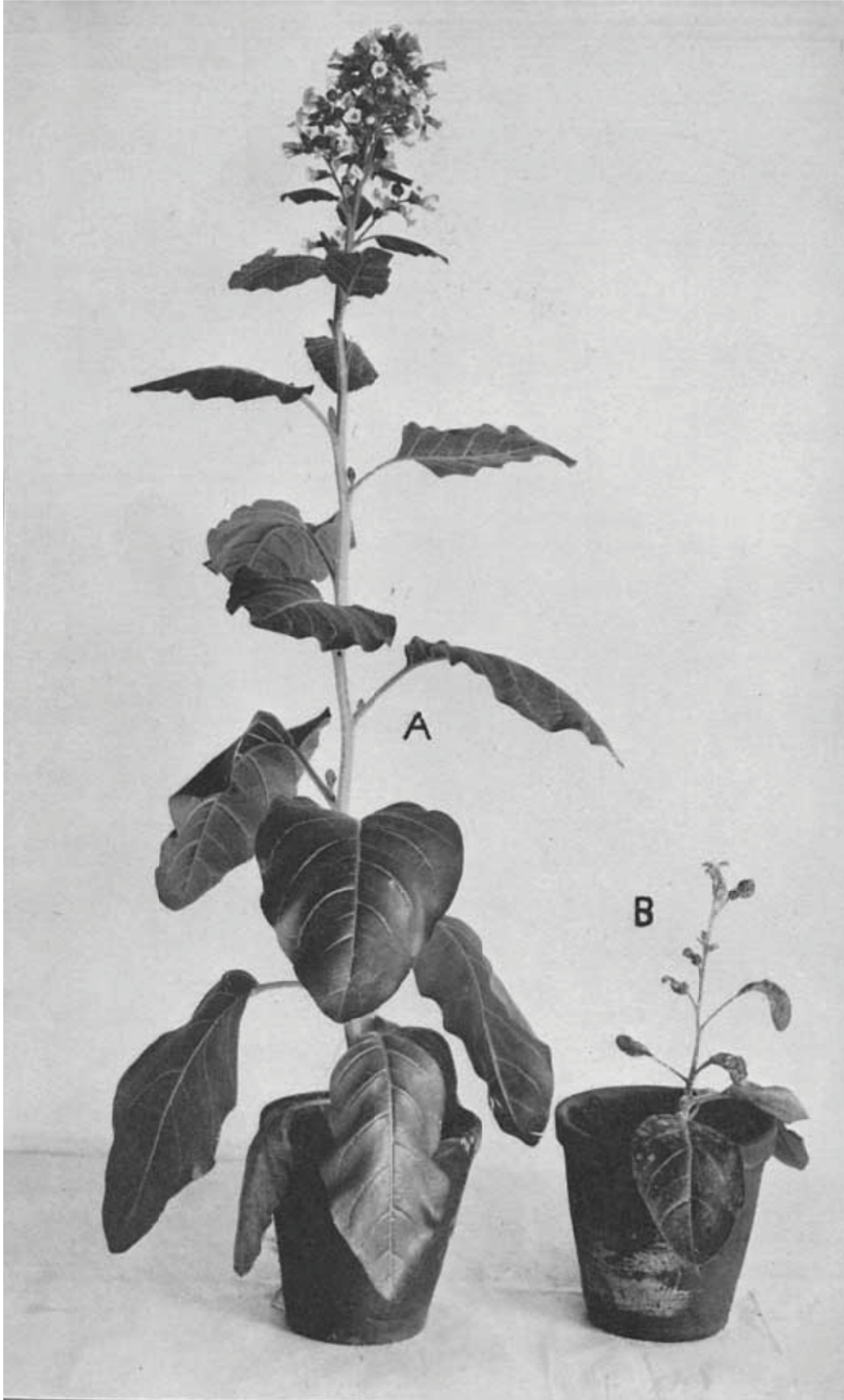


Figura 1: Doença do mosaico do tabaco em *Nicotiana rustica*. A: Planta sadia. B: Planta infectada pelo TMV (7). Observa-se à esquerda desenvolvimento normal com estatura e folhas maiores na condição sadia, quando da infecção por TMV verifica-se neste exemplo diminuição de estatura, comprometimento das funções de crescimento e obtenção de energia.

O TMV também tem espaço como um modelo didático por muitas das mesmas razões já citadas que o popularizaram como um sistema experimental excepcional. Em demonstrações de larga escala é um vírus de escolha – por conta das características de cultivo e custos de produção, fundamentando em sala de aula conceitos sobre propriedades físico-químicas, genética, fenótipo em plantas de tabaco (por exemplo, lesões locais em plantas de *N. tabacum* expressando o gene M), e passíveis de detecção por testes e kits disponíveis comercialmente. Modelos didáticos também dependem muito de simbolismo, tais como mapas genéticos, para explorar a essência de um sistema. Por exemplo, o mapa do genoma TMV é prático e específico. Um desenho (figura 2) detalha a constituição genética (5'-replicase-MP-CP-3') de um vírus biologicamente ativo em uma planta hospedeira.

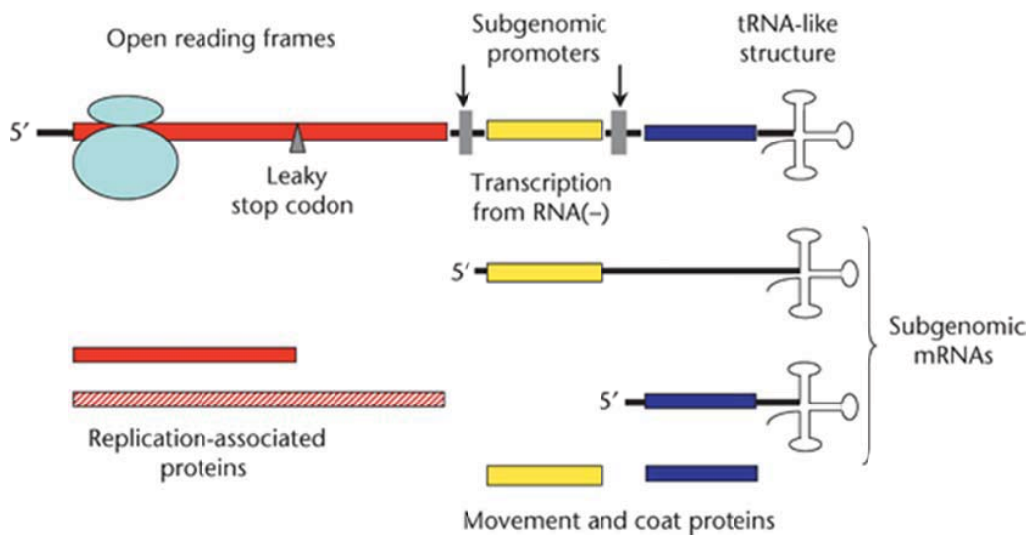


Figura 2: Descrição da estratégia de expressão do genoma do vírus do mosaico do tabaco (TMV). As setas vermelhas indicam tradução dependente do hospedeiro; setas azuis indicam a transcrição de um RNA (-) modelo. Caixas preenchidas são quadros abertos de leitura (ORFs), os quais são mostrados em diferentes cores. Caixas tracejadas indicam as proteínas. A região 5' terminal do RNA viral e os mRNAs têm uma estrutura cap com trifosfato de 7-metilguanósina (m7Gppp). A ORF mais próxima da extremidade 5' do RNA genômico é traduzida para uma proteína de 126 kDa. Um stop codon "leaky" permite leituras diferenciais, mas são pouco frequentes (1/10 vezes) e geram uma proteína com 183 kDa. Estas duas proteínas, juntamente com as proteínas do hospedeiro constituem a RNA polimerase RNA dependente RdRp. A enzima então transcreve um RNA polaridade negativa a partir de RNA genômico (+). A RdRp transcreve também o RNA (-) em RNA (+) (59).

Nos Estados Unidos, a estirpe do TMV utilizada por James Johnson (Wisconsin) foi distribuída para muitos dos pesquisadores, incluindo Holmes (Rockefeller), Knight (Berkeley), Sam Wildman (UCLA), e Wendell Stanley (Rockefeller, Berkeley). Estes cientistas tornaram o TMV um modelo bem definido e calibrado às condições laboratoriais, tornando-o uma referência ou padrão para a pesquisa nas ciências da vida. O TMV é, atualmente, imutavelmente móvel (5), ou seja, considerando a facilidade com que foi distribuído a cientistas de muitos países, e também o fato de filogenias para o TMV, de coleções em todo o mundo, serem notavelmente semelhantes. Esta descoberta foi possível através da

comparação das sequências de cDNA de contemporâneos do TMV (estirpes de laboratório) com amostras isoladas de folhas de tabaco, coletadas e armazenadas como espécimes de herbário por mais de 100 anos (40, 41).

Uma característica que, até agora, transporta o TMV para além de outros sistemas-modelo, como *Drosophila*, camundongos, ou mesmo *C. Elegans* (60-64), é a composição deste vírus, em termos de oligonucleotídeos, genes e proteínas que o compõe, facilita os estudos em biologia básica e geraram aplicações para a biotecnologia (65). Por exemplo, na porção 5' terminal do genoma do TMV, uma região da sequência líder, chamada omega ( $\Omega$ ), foi definida como responsável pelo aumento da tradução em duas a três vezes a expressão daquela proteína que o sucede, e portanto tem sido incorporada em vários vetores para aumentar a tradução de genes exógenos introduzidos para plantas transgênicas. Recentemente, determinou-se que  $\Omega$  recruta eficientemente eIF4F, um fator do hospedeiro necessário para a iniciação da tradução de mRNAs (66). Um exemplo do mecanismo de replicação do TMV pode ser encontrado na figura 3. Além disso, cópias de cDNA de promotores RNA subgenômicos do TMV foram engenheirados em vetores para projetar a expressão estável de genes exógenos após inoculação por esfregaço destes cDNA infecciosos em plantas hospedeiras (37, 43, 67, 68). Estes são apenas dois exemplos de como a estrutura e função dos poucos nucleotídeos no RNA do TMV têm em ambos os casos aplicações de pesquisa, práticas e de base, estendendo-se o papel deste vírus, portanto, como um sistema modelo.

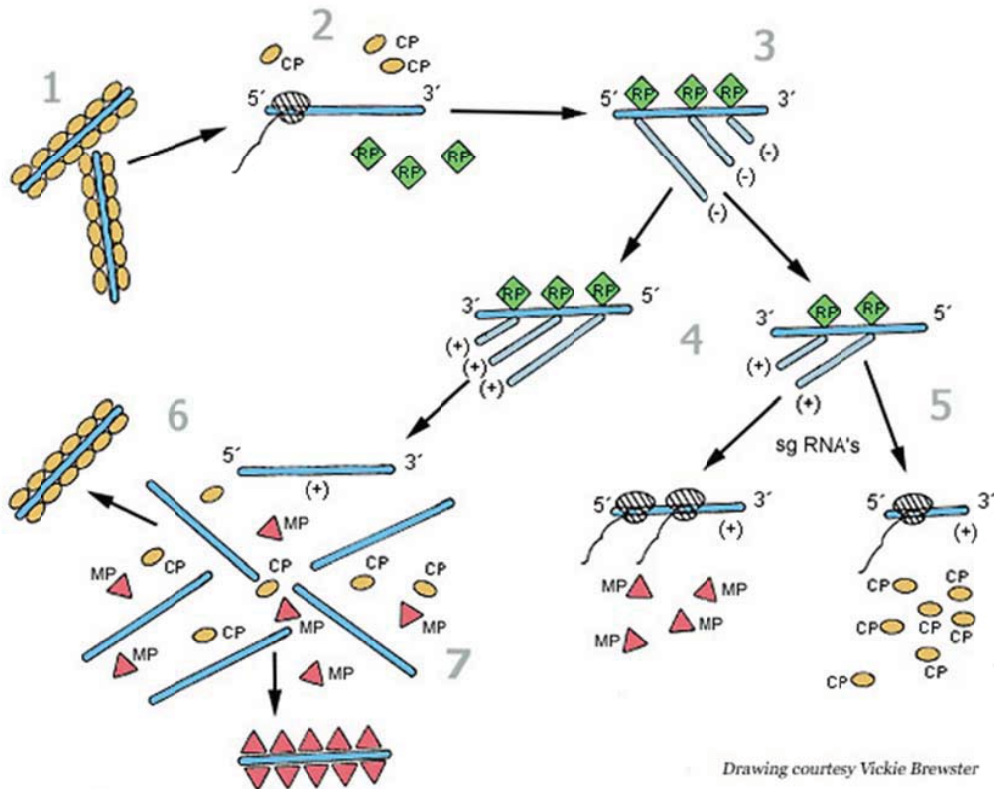


Figura 3: Modelo de replicação do vírus do mosaico do tabaco. Brevemente, após a entrada em seu hospedeiro através de inoculação mecânica, o TMV desnuda-se para liberar o RNA viral. Em seguida, o genoma viral começará a se replicar, produzindo múltiplos mRNAs. Os mRNAs gerados codificam para várias proteínas, incluindo a proteína do capsídeo e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), bem como a proteína de movimento. Depois de as proteínas e do genoma do TMV serem sintetizados, eles são agrupados espontaneamente em vírions completos em um processo altamente organizado. O RNA do vírus é de polaridade positiva, ou "sentido +", e serve diretamente como um RNA mensageiro (mRNA) que é traduzido utilizando ribossomos do hospedeiro. A tradução das proteínas associadas à replicase (126 kDa e 183kDa) começa logo após a infecção. Logo que estas proteínas são sintetizadas, os complexos formados pela replicase e proteínas relacionadas associam-se com a extremidade 3' do RNA viral para a produção de um molde em polaridade negativa. Este molde de RNA é o usado para a produção de ambos RNA genômico e subgenômicos. Os sgRNAs são traduzidas pelos ribossomos hospedeiro para produzir a proteína de movimento (MP) (30 kDa) e a proteína do capsídeo (CP) (17,5 kDa). A proteína de revestimento, em seguida, interage com o RNA recém-sintetizado para a montagem de virions da prole. Estas partículas virais são muito estáveis e, em algum ponto quando as células são lisadas são lançados para infectar novas plantas. Alternativamente, o RNA genômico é envolto em proteínas de movimento, e esse complexo pode infectar células adjacentes.

Fonte: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TobaccoMosaic.aspx> acessada em 27/11/2012

Vários genes do TMV que inicialmente eram de interesse para o desenvolvimento de vários tipos de resistência em plantas também tornaram-se importantes e sistemas modelo em causa própria, para estudos básicos em biologia vegetal. A proteína de movimento MP, com 30 kDa, tem sido utilizada para estudar os mecanismos de gating plasmodesmatal e análise de complementação da função do gene (isto é, a TMVmp pode suportar o movimento de vírus não-relacionados célula a célula), como discutido abaixo em detalhes. O cDNA da TMVcp também foi utilizado com sucesso para mediar proteção cruzada em plantas transgênicas (69, 70), e impulsionou o desenvolvimento da indústria de biotecnologia vegetal (6, 8, 12).

Outros usos práticos para o TMV foram encontrados usando o vírus como um vetor para a expressão de genes exógenos (43, 46, 67, 71, 72). Por exemplo, a modificação do genoma do TMV (figura 2) através da adição de um promotor do tobamovírus, com um RNA subgenômico heterólogo para conduzir a transcrição do gene da proteína fluorescente verde (GFP), permitindo a observação direta de TMV em movimento em *N. Benthamiana* (73). Complexos eventos bioquímicos na célula, que determinam o destino de proteínas e a indução de respostas do hospedeiro para a expressão de genes exógenos, foram também identificados por silenciamento seletivo de proteínas do hospedeiro associados com resistência, como discutido abaixo. O TMV também é um bom candidato para estudar cascatas de eventos celulares que ocorrem quando proteínas deformadas são identificadas, seqüestradas, e / ou degradadas pelo hospedeiro, com particular atenção para a via ubiquitina/26S proteossomo (74). Estes estudos foram úteis

para o modelo de interações celulares e moleculares empregados nesta tese. Por exemplo, a doença de Parkinson está associada com perturbações na via ubiquitina (Ub), que interfere com a degradação da alfa sinucleína resultando em acumulos em placas proteicas. O TMV também foi usado para dissecar as conservadas e complexas interações que ocorrem na via Ub/26S do proteossomo, inclusive em estudos para a doença de Parkinson (75). Este tipo de extensão de nossa compreensão do TMV em biologia geral atende às expectativas de Bawden, previstas há mais de 50 anos, que os avanços no conhecimento do comportamento do vírus "terá repercussões em assuntos considerados agora muito remotos a partir de patologia vegetal".

Na era da "ômicas" o TMV pôde manter seu status como um sistema modelo, ainda mais consagrado neste período. O TMV é um sistema modelo para a biologia contemporânea, tanto em conteúdo como em contexto. À medida que continuarmos a decifrar os detalhes moleculares do contexto de interações patógeno-hospedeiro e da biologia da célula eucariótica, o TMV continuará a figurar como exemplar ferramenta.

Uma área-chave onde TMV sido utilizado como força direcionadora amplia nosso entendimento sobre o movimento do vírus e os determinantes da interação patógeno-hospedeiro para resistência a doenças. Muito deste trabalho foi iniciado por Francis O. Holmes (1899-1990), que fez duas observações importantes sobre o TMV, que continuam a reverberar na pesquisa atual em biologia vegetal e



virologia: (a) movimento viral e (b) identificação do gene de resistência (e também como uma ferramenta para quantificar as infecções por ensaios de lesão local) (8).

A característica mais marcante em plantas e animais é a arquitetura básica celular. As plantas têm paredes de celulose em células que fornecem suporte estrutural (no lugar de um citoesqueleto), que aparentemente seria proibitiva para a comunicação intercelular. Para superar as limitações aparentes de uma parede celular rígida, as ligações tubulares formadas entre o citosol de células adjacentes, que permitem a comunicação e transporte de moléculas pequenas são exploradas pelo vírus. Estas ligações, ou plasmodesmos, são as portas através das quais a TMVmp associada a RNAg virais movem-se na planta infectada. Uma das perguntas mais intrigantes da biologia vegetal antigamente foi como o TMV transporta-se célula a célula. Esta questão foi abordada pela produção de plantas transgênicas de tabaco expressando a TMVmp. Estas plantas forneceram uma prova de conceito conclusiva de que a MP complementa o movimento célula-célula de uma estirpe sensível à temperatura de TMV e que a MP funcional localiza no plasmodesmos (PD) (76). Isto foi seguido pela observação do movimento do genoma do TMV através do plasmodesmos como uma longa e complexa ribonucleoproteína, fina (<2nm de largura), e composta de RNAg do TMV e TMmp (77). A TMVmp aumenta o limite de exclusão de tamanho (Size exclusion limit / SEL) de PD, permitindo que o complexo ribonucleoproteico trace seu caminho de uma célula para outra. Isto resultou em uma hipótese que uma planta não-infectada pode também transportar mRNA de célula a célula ou através de longas distâncias pela formação de complexos de ribonucleoproteína com

proteínas do hospedeiro (77). Estas descobertas abriram várias novas áreas de pesquisa em biologia vegetal onde o RNA e a TMVmp são usados para investigar o tráfego natural de proteínas do hospedeiro e de mRNA do hospedeiro, um modelo de replicação e processamento é representado na figura 4.

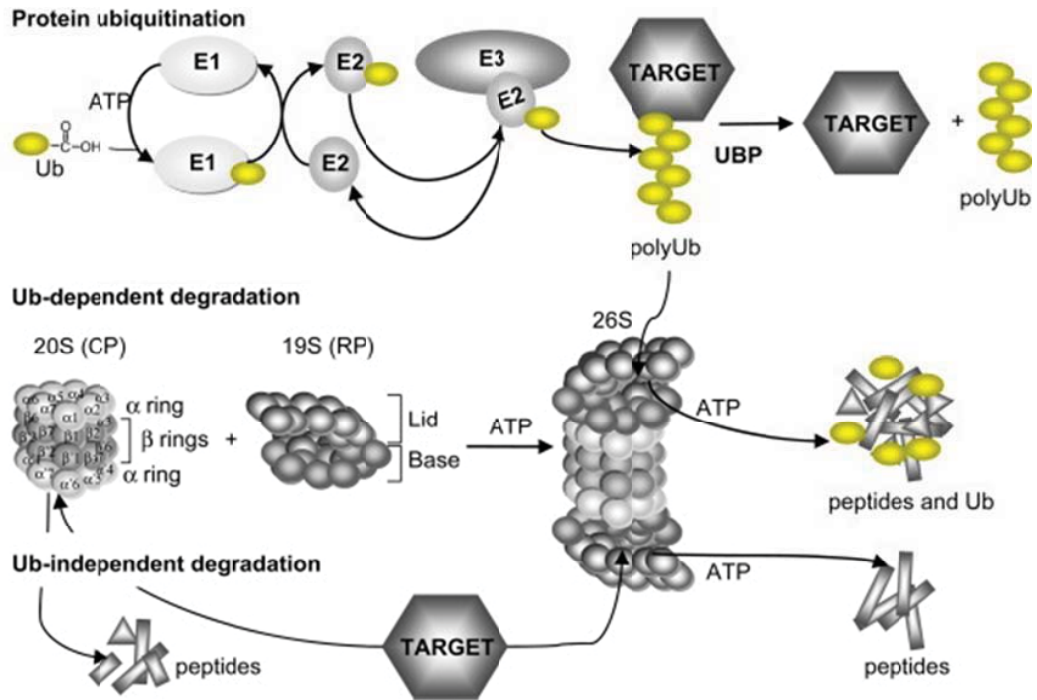


Figura 4: Modelo de replicação e degradação. À esquerda a representação dos sistemas de processamento de bactérias e fungos. À direita a representação da replicação e processamento do vírus do mosaico do tabaco (78). A Ub é uma proteína que é altamente conservada em todo o reino eucariótico. A fixação de Ub em proteínas celulares (referido como ubiquitinação) é envolvida na regulação de muitas vias de sinalização, e também desempenha um papel importante na homeostase da proteína e da célula. Três fases distintas no processo de ubiquitinação são controladas por três classes de enzimas: i) ativação de Ub através da enzima de ativação da ubiquitina (E1), durante o qual Ub é transferida para o E1; ii) transferência de Ub da enzima E1 para uma enzima de conjugação da ubiquitina (E2), e iii) a transferência de Ub da enzima E2 para a proteína substrato, um processo realizado pela ligase E3, que coordena ubiquitinação, fornecendo uma plataforma de ligação de enzimas específicas e E2 substratos. A proteína Ub liga-se à proteína alvo por meio de uma ligação entre o seu peptídeo C-terminal Gli e um aminoácido da proteína substrato alvo, na maioria dos casos, uma lisina. Esta modificação (mono-ubiquitinação) pode, então, ser estendida através de ligação de outras moléculas Ub.

Vários estudos relacionados utilizam o TMV para investigar os mecanismos pelos quais o transporte de proteínas do vírus e do hospedeiro foram bloqueados ou facilitados no tabaco. O estudo das características replicativas do TMV no tabaco estavam na vanguarda para determinar como as proteínas de movimento de vírus causam alterações físicas no PD, permitindo o trânsito de grandes macromoléculas. Uma década atrás, diversos estudos mostraram que a TMVmp por si só, expressa como um transgene ou pela microinjeção em células, permitiu medições diretas dos SEL utilizando marcadores fluorescentes marcadas com dextrano. Outro fato interessante relaciona a TMVmp acumulada no PD a outras observações sobre o desenvolvimento da célula vegetal. Por exemplo, a TMVmp é biologicamente ativa quando fosforilada, o que apontou para a descoberta de que quinases estão associados com o PD. Por sua vez, isso sugere que o hospedeiro utilize o PD como um mecanismo de propagação regular do trânsito de proteínas célula-célula (76, 77, 79). Além disso, proteínas do hospedeiro também podem contribuir para impedir o movimento. A pectina metilesterase (PME) é necessária para o crescimento e desenvolvimento normais da célula vegetal e que também pode estar envolvida na propagação do TMV. Partículas de TMV defeituosas para a proteína de movimento ligam PME menos eficientemente e o movimento célula-célula é bloqueado. Em outra experiência, o silenciamento do gene foi utilizado para reduzir a expressão da PME em 80% na célula da planta, retardando o início da disseminação de longa distância (sistêmica). Isto sugeriu que o movimento é um processo polarizado, ou regulado, em que o ingresso de complexos macromoleculares (tais como TMVmp-RNAg) para a vasculatura não garante

saída subsequente para tecidos não vasculares (80). Dentro do contexto acima, proteínas do hospedeiro e arquitetura celular facilitam a replicação e movimento do TMV. A figura 5 representa a função da proteína de movimento do TMV.

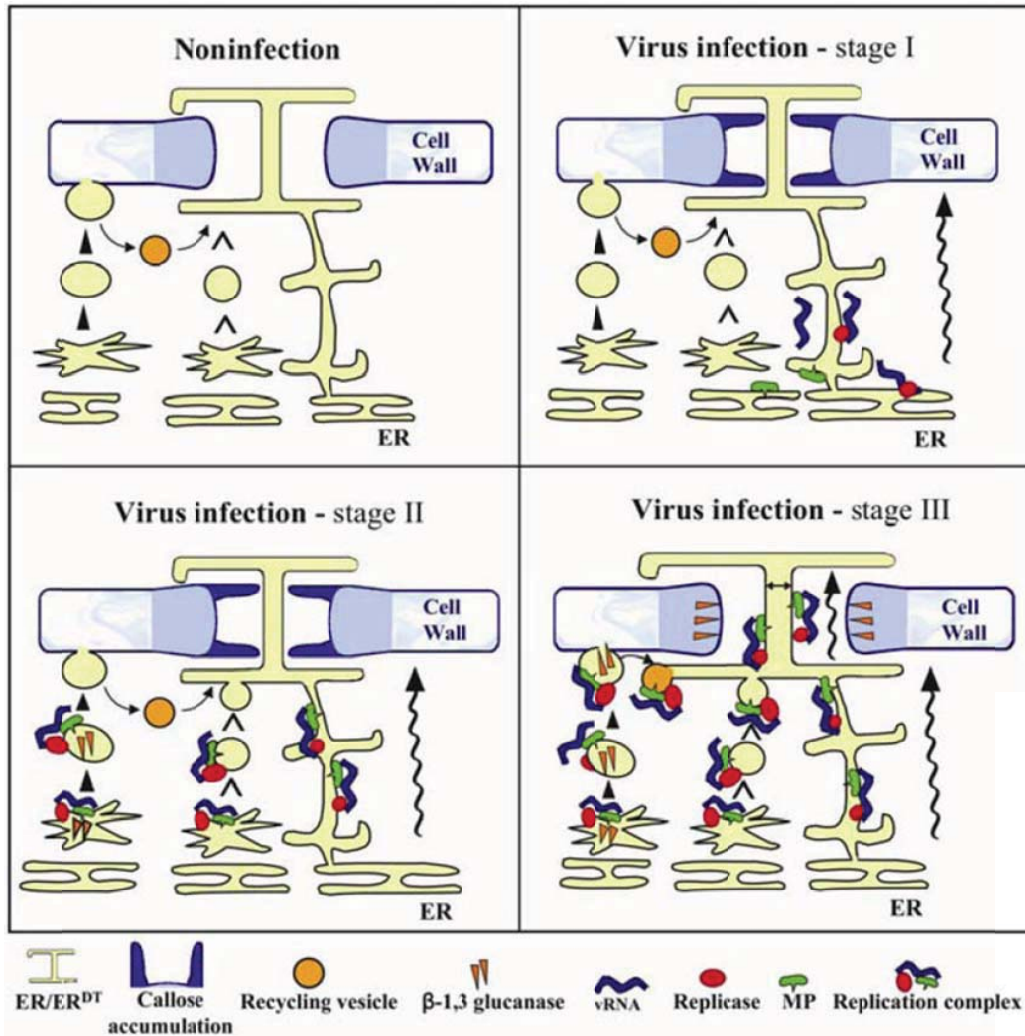


Figura 5: modelo de transporte célula a célula via proteína de movimento do vírus do mosaico do tabaco. Um modelo de difusão célula-a-célula do vírus do mosaico do tabaco. Infecção inicial do RNA viral (RNA<sub>v</sub>) permite a síntese de replicase, que por sua vez gera RNAs de polaridade positiva e negativa (RNA<sub>v</sub> e RNA<sub>s</sub>). Ocorre também a tradução da proteína de movimento (TMVmp) e da proteína do capsídeo (TMVcp). Em resposta à infecção, ocorre acúmulo de calose na região de parede em torno do plasmodesmata (Pd) restringindo a fenda citoplasmática. MP, associada à membrana do retículo (ER) funciona como uma jangada proteica para o RNA<sub>v</sub> com seus domínios citoplasmáticos, formando um complexo de replicação (VRC) que também pode conter a replicase.

O tráfego intracelular do VRC para o ER cortical ocorre quer por difusão nos lipídios ou por tráfego vesicular. O VRC difunde através do Pd para células adjacentes por desmotubulos contínuos dependente do gradiente de concentração entre uma célula infectada e as adjacentes não infectadas (81).

Outros complexos macromoleculares em plantas foram definidos como componentes essenciais de defesa do hospedeiro e da capacidade de TMV para explorar tais complexos para o movimento. Por exemplo, a replicação do TMV foi identificada em membranas associadas ao retículo endoplasmático (ER) (82). Além disso, a TMVmp é colocalizada no RE, suscitando a questão sobre como o RNA do TMV complexado à TMVmp atinge o PD. Vários aspectos destes processos foram esclarecidos, atualmente existem aparentemente duas estratégias de encaminhamento para a TMVmp. Estudos com a forma mutante da proteína demonstraram que essa capacidade de deslocamento para o PD e consequentemente aumento da SEL pode ser distinguido do direcionamento para microtúbulos. A partir destas conclusões, determinou-se que ao menos uma porção da TMVmp é regularmente eliminada por uma proteína associada a microtúbulo (MPB2C) de *N. tabacum*, como um possível meio de interferir com (ou competir com) o transporte de célula a célula. Até agora, o papel celular dessa proteína expressa constitutivamente com 36 kDa é desconhecida. No entanto, é bastante possível que a localização aos microtúbulos induza a ubiquitinação e degradação, uma resposta de limpeza para dispor de proteínas deformadas ou agregados proteicos. Estudos recentes sugerem que a interação entre a proteína TMV 126-kDa e da proteína N desencadeia a via de degradação completa por Ub/26S proteossomo, como discutido abaixo. Estes exemplos fortalecem o TMV e suas proteínas como excelentes candidatos para modelagem, tanto da

manutenção de *turnover* proteico, como também de estratégias de defesa na célula vegetal.

Outras proteínas codificadas por *N. tabacum* foram identificadas com papel íntimo na orientação MP para o PD, incluindo NCAPP1, uma proteína 40 kDa com um domínio transmembranar amino-terminal que tem como alvo a proteína para o ER. Aparentemente a proteína NCAPP1 (isoladamente ou como um componente de um complexo macromolecular ou via) está associada com a função guia da MP para o PD e / ou translocação célula a célula (83).

As interações bioquímicas entre a maquinaria da célula hospedeira e o TMV foram avaliadas por abordagens diretas com base em ensaios duplo-híbridos para identificar proteínas do hospedeiro que interagem com a replicase TMV (em particular a região 50-kDa na porção C-terminal de 126 - kDa proteína replicase; figura 2). Esta estratégia resultou na identificação de várias proteínas do tabaco que estão associadas com respostas a tensões celulares, incluindo proteínas de choque térmico (HSP) e os componentes da via Ub/26S proteossomo (84). A técnica de silenciamento genético foi utilizada para confirmar algumas destas interações e, em cada caso, o efeito produzido foi a redução ou abolição da resposta à infecção TMV, por exemplo, quando a Hsp90 foi suprimida, houve interferência no crescimento e desenvolvimento da planta, bem como resistência mediada pelo gene N (84).

Mesmo eventos clássicos, como proteção cruzada estão abertas para reavaliação molecular. Por exemplo, uma estirpe atenuada do vírus do mosaico do

tomate (ToMV L11A) é usada por pelo menos 30 anos para proteger as linhagens comerciais de tomate (85). O ToMV L11A foi identificado como uma estirpe com proteção cruzada eficiente porque não produz sintomas e move-se sistemicamente. Este efeito protetor foi reduzido a partir da alteração de um único aminoácido na região 126-kDa do gene da replicase do TMV. A determinação de que esta estirpe atenuada é permissiva para silenciamento pós transcricional do gene fornece um mecanismo pelo qual a mutação L11A protege plantas hospedeiras de infecção pelas estirpes graves de ToMV (86).

## **1.2 Proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco**

As propriedades antigênicas do vírus do mosaico do tabaco (TMV) têm sido estudadas extensivamente, em muitos laboratórios, por mais de 50 anos (30, 87-89). O TMV é um excelente imunógeno e anticorpos contra o vírus podem ser facilmente obtidos através de imunização de animais experimentais. Na década de 1930, já havia sido observado que o antisoro produzido contra TMV foi capaz de neutralizar a infecciosidade do vírus Rappaport (1965). Após a proteína do capsídeo do TMV (TMVcp) ser sequenciada (90), tornou-se possível, pela primeira vez, localizar os sítios antigênicos de uma proteína viral em nível molecular. Dois sítios antigênicos de TMVCP foram escolhidos para análise nestes estudos iniciais: a região C-terminal, que corresponde aos resíduos 153 - 158 (90, 91) e a região do laço desordenado correspondente aos resíduos 93 - 112 (88). A figura 6 mostra a cristalografia depositada da proteína do capsídeo do TMV.

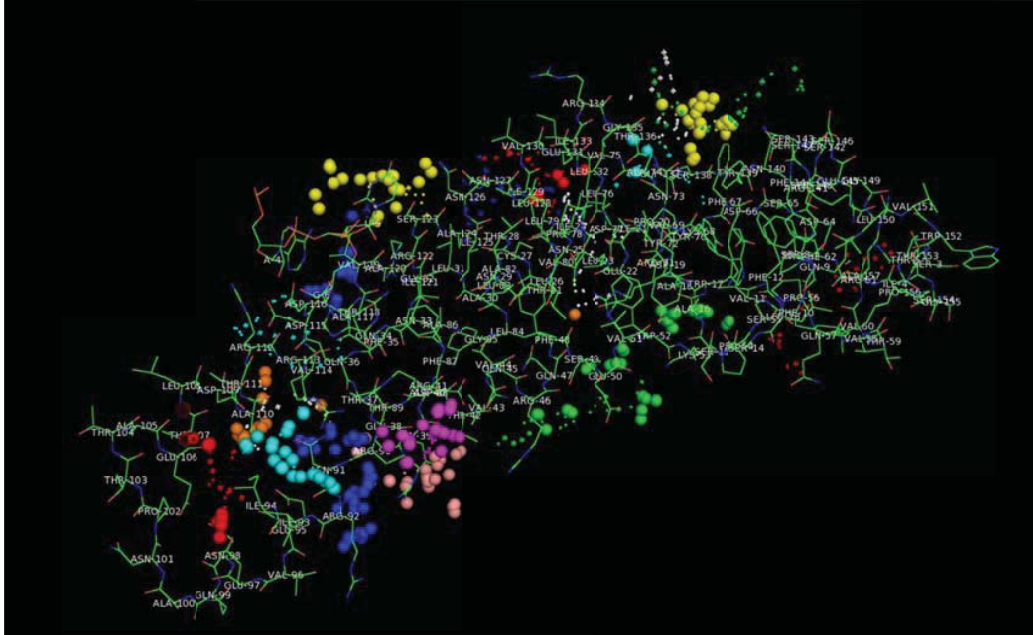


Figura 6: Cristalografia da proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco. Estrutura marcada pelo software PyMol (academico version, filtros para bolsões) ressaltando as regiões com cavidades (esferas em cores para diferenciação) e também a orientação da sequência da proteína. Estrutura utilizada 3J06.pdb já depositada no banco de dados de proteínas (PDB).

Anderer e colaboradores testaram peptídeos obtidos por degradação triptica de TMVcp quanto à sua capacidade para inibir a reação entre o vírus e o anticorpo, e mostraram que o hexapeptídeo C-terminal possuía a maior atividade neutralizante. Este hexapeptídeo, acoplado a soro albumina bovina, foi utilizado para criar anticorpos em coelhos e, o soro resultante foi efetivo em precipitar o vírus e neutralizá-lo (90). Em outro trabalho, fragmentos de peptídeos naturais, bem como os sintéticos foram utilizados. Anderer, e seus colaboradores devem ser creditados com a descoberta de que peptídeos sintéticos são capazes de elicitar anticorpos neutralizantes. A significância destes avanços para o desenvolvimento de vacinas sintéticas foi reconhecido apenas 15 anos depois,



quando os resultados semelhantes foram obtidos com vírus de animais (92). Os anticorpos obtidos por imunização de animais com tripeptídeo C-terminal, conjugado à TMVcp, também foi neutralizante. Um resultado interessante e inesperado foi a demonstração de que os anticorpos preparados contra um único resíduo terminal de treonina na TMVcp, acoplado a uma proteína transportadora, também foram capazes de precipitar o vírus (90, 91). Este resultado é provavelmente devido à localização particularmente exposta do resíduo C-terminal em TMVcp (93, 94).

Os determinantes antigênicos para a proteína do capsídeo também foram estudados em maior resolução nos anos seguintes. Alguns dos anticorpos presentes em antisoros contra TMV reagiram de forma cruzada com a proteína de revestimento dissociada, ao passo que outros anticorpos reagiram apenas com virions intactos (95, 96). Foi sugerido por Aach (97) que os anticorpos virion-específicos reconheceram determinantes antigênicos que surgiram por justaposição de resíduos vizinhos das subunidades das proteínas. Uma vez que o estado de agregação das subunidades virais influenciam propriedades antigênicas, uma série de termos foi introduzida para distinguir entre os diferentes determinantes antigênicos encontrados na superfície de virions e de subunidades dissociadas (98). Uma vez que os determinantes antigênicos foram referidos como epítomos (99), novos epítomos, que surgem nas subunidades virais polimerizadas, como um resultado da estrutura quaternária, cunhou-se o termo neotopos. Neotopos podem ser constituídos por resíduos de subunidades vizinhas, que por sua vez são reconhecidas como uma entidade única, por certos anticorpos. Por

outro lado, uma vez que os laços da subunidade que mantêm as partículas virais em conjunto vírus podem alterar a conformação das subunidades, novos epítomos conformacionais (neotopos) aparecem nos virions e não são identificados nos monómeros de proteína. Na prática, a base estrutural da especificidade de neotopos é quase sempre desconhecida, de modo que o rótulo neotopo é dado a qualquer epítomo do vírus que não está presente no capsômero *per se*. Quando subunidades polimerizam-se, uma porção da proteína superfície torna-se oculta e isso leva ao desaparecimento de determinados epítomos encontrados na proteína monomérica viral. Tais epítomos, que foram denominados criptotopos (87, 98-100), por tornarem-se acessíveis aos anticorpos somente após dissociação da partícula viral.

Uma terceira nomenclatura, metatopo, foi introduzida para epítomos encontrados em ambas as formas nativas e dissociadas da proteína viral (30, 98, 101). Inicialmente, a existência de anticorpos específicos para neotopos, criptotopos e metatopos foi estabelecida por experimentos de absorção cruzada (97). Depois da interação de antisoros TMVcp com partículas de vírus, anticorpos residuais reagem com as subunidades dissociadas para reconhecimento de criptotopos. Com o advento da tecnologia de hibridomas, tornou-se mais fácil distinguir estes diferentes antígenos com anticorpos monoclonais (102, 103) e também para mapear a posição de neotopos, metatopos e criptotopos na superfície de antígenos virais (102). Deve notar-se que nem todos os formatos de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são igualmente adequados para estabelecer se os anticorpos monoclonais (MAb) reagem com estes tipos de epítomos. A

natureza do antigênio que reage em ELISA pode ser visualizada quando o ensaio é realizado em associações com microscópio eletrônico acoplado ao fundo dos poços de microtitulação, e o antigênio reativo é subsequentemente identificado pela imunomicroscopia (102). Imunomicroscopia usando anticorpos marcados com ouro são usados para melhor visualizar a localização da neotopos e metatopos sobre partículas TMV. A maioria dos MAb levantados contra TMVCP foram específicos metatopos (Al Moudallal et al. 1985) e foram localizados em uma das duas extremidades das hastes virais. A exposição da extremidade 5' do RNA em partículas virais pela ação de ureia 6M demonstrou que os metatopos encontrados localizam-se na extremidade do virion (Dore et al. 1990). Foi também demonstrado por microscopia imunoeletrônica que estes anticorpos antimetatopos reagiram com ambas as extremidades dos discos agregados de TMVCP. Isto implica que a mesma face da subunidade, ou seja, aquele que contém as duas hélices correspondentes às regiões dos resíduos 73 a 89 e 115 a 135, que são expostas em ambas as extremidades nos discos empilhados (Dore et al. 1990). Os camundongos usados para produção do hibridoma foram imunizados com preparações de TMVCP altamente concentrada, continha discos empilhados da estrutura helicoidal, e graças à presença de sítios de interação em ambas as faces do disco houve predominância de MAb com especificidade para esta superfície (104). Uma vez que estes anticorpos anti-metatopos ligaram à extremidade das hastes virais, o que é conhecido como desmontagem do capsídeo durante o processo de infecção, experimentos foram realizados para avaliar se esses anticorpos eram capazes de bloquear esse processo. Verificou-se que cerca de

metade dos anticorpos anti-metatopos que foram analisados inibiram fortemente a desmontagem e também tradução do RNA, enquanto os outros inibiram apenas fracamente o processo (105). A figura 7 resume as informações sobre epitopos conformacionais da TMV/cp.

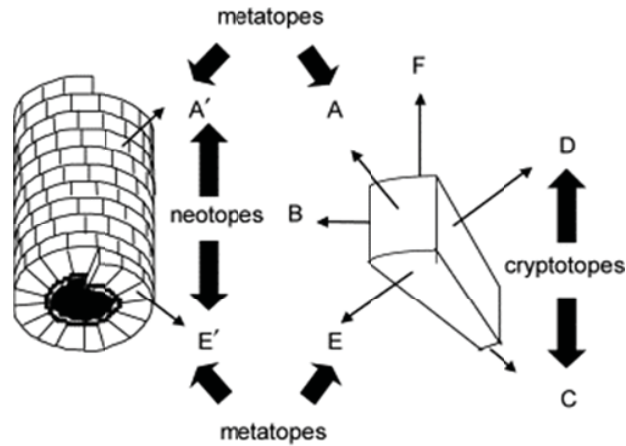


Figura 7: Representação esquemática da orientação e reconhecimento antigênico da proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco. Modelo esquemático de sub-unidades proteicas do TMV em forma monomérica e na partícula viral. Neotopos são encontrados nas superfícies A' e E', metatopos são encontrados nas superfícies A, A', E e E', e criptotopos são encontrados nas superfícies B, C e D. Os tipos de epitopos presentes na superfície F não foram definidos. A extremidade E0 do vírion contém a extremidade 5' do RNA (87).

O conhecimento da afinidade de um dos anticorpos é importante para o adequado planejamento de imunoenaios e, portanto para compreender a atividade biológica destas imunoglobulinas, por exemplo, na neutralização da infectividade do vírus (106). No entanto, parece que, em alguns casos, a presença de muitas subunidades idênticas de subunidades virais na superfície de virions pode favorecer a ligação dos anticorpos bivalentes. A incerteza sobre a natureza monovalente ou bivalente da ligação do anticorpo às partículas de vírus foi

resolvida, no caso do TMV, quando foi demonstrado que ambos os tipos de ligação ocorreram de acordo com as taxas de antígeno e anticorpo (107).

Os estudos iniciais de interações em TMV por meio de anticorpos clássicos, Scatchard havia usado como valência antigênica o número de subunidades idênticas de proteína (2130) no virion. Isso deu origem a regiões lineares, que eram erroneamente interpretadas como evidência para ligação de anticorpo homogêneo (108).

No entanto, quando os resultados de Scatchard foram analisados cuidadosamente verificou-se que a valência antigênica do vírus poderia ser experimentalmente determinada verificou-se também que a organização das subunidades exercia um efeito bloqueador de epítomos devido a um obstáculo alostérico (109). Como esperado com anticorpos policlonais muitas regiões de interação foram determinadas com as metodologias convencionais, mas não sem grandes variações nos resultados em termos de reconhecimento e cobertura. Este trabalho trata especificamente deste tema para a condição nativa da proteína viral, com o uso de um sistema de mapeamento de epítomos lineares via peptídeos sintéticos produzidos paralelamente em membrana de celulose através de spot synthesis.

### **1.3 Mapeamento de epítomos e Spot Synthesis**

As proteínas são moléculas mais importantes para todos os aspectos de vida. O mapeamento de epítomos prove uma ferramenta importante para melhor compreendermos suas funções moleculares. Dependendo do tipo de célula imune que reconhece a proteína alvo de epítomos célula B e epítomos de células T são distinguidos. Epítomos de células T pode ser ainda dividido em T-helper, T-killer (células T citotóxicas, CTL) e epítomos T supressores. Para a busca pela áreas de uma proteína que são acessíveis para o sistema imunológico a síntese de peptídeos múltiplos é uma tecnologia muito eficiente.

Aplicações importantes de mapeamento de epítomos são encontradas dentro da área de imunoquímica. Para o desenvolvimento de vacinas sintéticas, o rápido e eficiente mapeamento de epítomos são passos essenciais. Proteínas que são não fazem parte do repertório imunológico, gerado durante o processo de seleção clonal de diferenciação de células B e T, são reconhecidas pelo sistema imunológico. Frequentemente estas são proteínas de superfície de bactérias ou proteínas virais. Se os epítomos destas proteínas são conhecidos, podemos, em tese, empregá-los para ellicitar resposta imune. Esses segmentos protéicos, frequentemente peptídeos relativamente curtos dependendo do tipo de resposta a ele associada, mimetizam a infecção pelos microrganismos, já que podem atuar como imunógenos e são frequentemente associados a um potencializador da resposta (110, 111).

O desenvolvimento de vacinas totalmente sintéticas, sem qualquer agente patogênico, foi demonstrado possível para respostas B e T. Tal abordagem reduz as desvantagens das vacinas com patógenos atenuados ou inativados, que lançam mão do mecanismo tradicional de apresentação e memória, mas dependem de partículas integras, embutindo, portanto, risco ao procedimento (112). A imunização com vacinas sintéticas têm sido descritas contra bactérias (113), vírus de plantas – neste caso o próprio TMV – (90) e com vírus animais (92). Os imunogênios sintéticos são capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra os alvos iniciais (114), protegendo os animais da infecção (115) e para induzir proteção específica de longa duração por linfócitos T citotóxicos (116).

Em geral, os epítomos de proteínas podem ser incorporados na síntese dos imunógenos para a produção de anticorpos poli ou monoclonais (117). Os próprios anticorpos são úteis em muitas outras aplicações. São ferramentas eficientes em biologia molecular (118), bioquímica (119). Alguns exemplos importantes e comuns da utilização destes anticorpos estão na identificação proteínas específicas em ou sobre uma célula, de tipo de células ou de espécies celulares, a investigação da liberação de compostos, o processamento e na regulação de processos, bem como a localização física de uma proteína no microambiente celular. Considerando que a imunização com a proteína inteira é frequentemente possível, o uso peptídeos sintéticos neste caso dependeria da administração apenas da sequência de DNA que codifica para a proteína (120). Quantidades muito limitadas, muitas vezes apenas da proteína estão disponíveis nestas preparações são necessárias e anticorpos dirigidos contra partes específicas ou

funcionais da proteína são os resultados esperados (121). Tais anticorpos podem ser usados para o bloqueio de domínios proteicos (122), para mimetização e caracterização de receptores (123, 124), ou para obter informações sobre a estrutura 3D de proteínas virais e bacterianas (125). Peptídeos sintéticos, que constituem as sequências dos epítomos de uma proteína, podem ser usados em muitas aplicações: no campo do diagnóstico, uso de peptídeos contra soros-pergunta podem detectar a presença de anticorpos no sangue e, portanto, indicativos de infecção. O desenvolvimento de bioensaios, com base em interações ligante-receptor (126), também foi descrita para epítomos peptídicos. Além do desenvolvimento de kits de diagnóstico baseados na tecnologia ELISA (127) são utilizados para a caracterização de anticorpos mono ou policlonais em soros (128, 129). Para a investigação de cruzada (130) e para a pesquisa de base para compreender os mecanismos moleculares de resposta imune para epítomos peptídicos sintéticos, jogando luz na questão da interpretação antigênica pelos organismos.

Epítomos são segmentos de uma proteína. As células do sistema imunológico reconhecem vários aminoácidos de uma proteína quando em orientação específica, através dos receptores na superfície da célula. Os aminoácidos de um epítomo reconhecido por um anticorpo estão localizados na sequência desta proteína, ou uma conformação (uma face de uma  $\alpha$ -hélice) ou são colocados em diferentes domínios. Portanto, organização seqüencial (linear, contínua), conformacional e descontínua são as possíveis formas de reconhecimento de epítomos (131, 132). Soma-se a esta conjuntura os peptídeos



glicosilados, cujos sítios em uma proteína podem ocultar epítomos como mecanismo de escape. A maior parte dos epítomos identificados até agora são peptídeos lineares. A identificação de epítomos descontínuos e dos epítomos conformacionais foi conseguida por modificação química do antígeno em proteínas livres somada à forma anticorpo-ligada através de proteólise deste complexo. Por exemplo, um anticorpo monoclonal ligando ao citocromo C de cavalos diminuiu a taxa de modificação química dos aminoácidos envolvidos nos epítomo (133). Em mais um exemplo, um anticorpo monoclonal diminuiu a taxa de clivagens proteolíticas nas áreas imunológicas envolvidas (134) Um epítomo descontínuo da anafilotoxina ligada à proteína do complemento C3a foi identificada por proteólise limitada de um complexo antígeno-anticorpo imobilizado combinada com análises de espectrometria de massas (135). Três estratégias gerais para o mapeamento de epítomos lineares e, sob condições especiais, para epítomos conformacionais são freqüentemente aplicadas:

Mapas completos de peptídeos sintéticos por síntese múltipla com sobreposição de aminoácidos é outro método interessante de investigação imunológica. A sobreposição de segmentos de peptídeo que englobam toda a seqüência da proteína é utilizada para o rastreamento de anticorpos ou para a imunização. Os peptídeos são obtidos por síntese química simultânea de muitos peptídeos (136, 137).

Bibliotecas de peptídeos organizadas em arranjos, como os mencionados, são um conjunto de antígenos possíveis do ponto de vista de um anticorpo. A

mistura de milhares de peptídeos é oferecida a anticorpos e as respostas, catalogadas. Epítomos lineares e seqüências lineares que imitam epítomos descontínuos podem ser descobertos por esta tecnologia, mesmo se o antígeno nativo não é conhecido (138-142).

Informações importantes sobre a conformação de antígenos derivam também da estrutura tridimensional destas proteínas. Diversas análises bioquímicas ao longo dos anos identificaram propriedades nestas estruturas peptídicas que explicam em grande parte as razões para reconhecimento molecular destes antígenos, após processamento e apresentação dos epítomos ali contidos. Algumas destas propriedades são exploradas abaixo.

Áreas de superfície de uma proteína são mais flexíveis do que segmentos transmembranares ou que o núcleo da proteína (143). Voltas e conformações  $\alpha$ -hélices anfífilicas são frequentemente encontradas na superfície e, portanto, acessíveis aos anticorpos (53, 144, 145). A fim de prever os segmentos antigenicos potenciais diretamente a partir da seqüência de aminoácidos da proteína várias técnicas assistidas por computador foram desenvolvidas, que utilizam conjuntos de parâmetros diferentes e algoritmos diferentes. Karplus e Schultz (1985) utilizaram parâmetros derivados de aminoácidos investigados com raios-X em análise de proteínas para determinar a flexibilidade das partes específicas da estrutura (146). As comparações de dados estruturais revelaram que certos aminoácidos parecem mais prováveis em conformações rígidas do que outros. Estas partes rígidas constituem segmentos interiores de uma proteína,

enquanto que outros aminoácidos com parâmetros mais elevados de mobilidade estão localizados em regiões de superfície. Análises de hidrofiliidade e hidropatia também sugerem quais os segmentos interiores e exteriores de uma proteína. A entalpia da transferência a partir de água para etanol (147) ou a partir de água para a vácuo (148) de cada aminoácido são usadas como parâmetro para estimar hidropatia ou hidrofiliidade.

De um modo semelhante, Welling (149) utiliza as sequências de epítomos definidos experimentalmente para relacionar determinados aminoácidos de acordo com a probabilidade de sua aparência nestes segmentos. Para todos os métodos diferentes, cada aminoácido recebe um valor de acordo com o conjunto de parâmetros. A sequência da proteína é mapeada por quadros de 5 a 9 resíduos. O valor médio dos aminoácidos dentro da moldura é dado ao resíduo do meio. No entanto, em alguns algoritmos, a distância do valor do aminoácido do meio é também considerada.

Estruturas secundárias, tais como helicidade, folhas  $\beta$ , ou conformação helicoidal podem ser prevista a partir de proteínas com estrutura 3D conhecida. Dados experimentais de análise conformacional revelam que certos aminoácidos são encontrados com maior probabilidade em conformações definidas (150). A maior probabilidade do conteúdo de uma hélice é encontrada para os segmentos que contêm Ala, Glu ou Met, enquanto que Gly, Tyr, Pro e Asp mais provavelmente perturbam estas hélices. Para suporte Ile, Val e Tyr, para

conformação, ao passo que Asp, Glu e Lys perturbam a estrutura. A alta frequência de Pro, Asn, Gly, Cys e Trp foi associada com voltas na estrutura. Muito raramente Val, Met, Glu Leu e Ile são encontrados em segmentos de volta. No intuito de obter uma análise da estrutura secundária, um valor é dado a cada aminoácido de acordo com os parâmetros descritos acima. No entanto, a combinação de resíduos frequentemente encontrados na mesma conformação também é considerada. Assim, uma Gly-Pro aumenta a probabilidade de um segmento em uma curva de predição (150). Parker (151, 152) introduziu um novo método para a caracterização das sequências peptídicas. Tripeptídeos sintéticos foram investigados por HPLC e os tempos de retenção foram usados para obter um conjunto de parâmetros experimentalmente verificáveis para uso de base na predição da estrutura secundária, bem como para a determinação de epítomos. A previsão da estrutura secundária em proteínas tem sido realizada utilizando um algoritmo de redes neurais (153), em que as regras, obtidas a partir de sucessos experimentais anteriores são utilizadas em previsões adicionais. Infelizmente cada um dos métodos para prever epítomos tem apenas uma probabilidade limitada. Para a previsão de estrutura secundária foi confirmada por Kabsch e Sander (154) em 50-56%. Algoritmos mais refinados (155) e o uso da combinação de parâmetros (156) levou à melhoria da predição. Maiores avanços foram obtidos, quando em adição à sequência da proteína em questão puderam ser comparadas com proteínas homólogas dentro de tal análise (157). Epítomos de células B são frequentemente encontrados em segmentos de proteína, que exibem valores elevados de hidrofobicidade e de baixos valores de antigenicidade / hidrofobicidade.

Tais partes de uma proteína são na maior parte das vezes flexíveis e muitas vezes, em conformações espirais (158) ou  $\alpha$ -helicoidais. Isto foi verificado em vários exemplos, tais como na identificação de epítomos em receptor de fator de crescimento (159), de hormônio de crescimento bovino (160), da proteína do envelope do HIV (161) entre outros muitos exemplos. Em contraste, Middeldorp e Meloen (162) encontraram apenas a confirmação limitada dos métodos de predição. Em mapeamento realizado pelos autores os 1381 aminoácidos da proteína do capsídeo do vírus de Epstein-Barr identificou dez grupos de epítomos. Embora estas regiões não fossem sugeridas pelos métodos de predição para ser mais antigênica, foram localizadas na predição de conformação.

A resposta imune mediada por anticorpos requer além da combinação antígeno-anticorpo adequada, o apoio de células T auxiliaadoras, que podem ser resumidas como se segue: As células B ligam a proteína estranha com seu anticorpo. A política para proteínas externas – as chamadas proteínas não-self de origem viral ou bacteriana origem - é corte em pequenos fragmentos de peptídeos no interior da célula, o que requer enzimas proteolíticas. Os segmentos peptídicos curtos são então apresentados na superfície celular em combinação com moléculas de MHC de classe II. Este complexo de MHC de classe II com o peptídeo clivado associado é reconhecido pelo receptor de célula T auxiliadora. No caso de o reconhecimento de um péptido derivado de uma proteína não-self, a T-auxiliadora libera fatores celulares, tais como interleucinas, que estimulam Células B, levando à proliferação e, assim, à produção de anticorpos. Ao lado das células T auxiliaadoras, que são caracterizadas pela proteína marcadora CD4, as

células T citotóxicas (CTL), que carregam o marcador CD8, são uma parte importante do sistema imunológico. CTLs são capazes de destruir células infectadas por lise e, assim, impedir a replicação do vírus (163). Em contraste com as células B, células T reconhecem epítopos não-self somente são digeridos e apresentados pelo MHC classe I em células que apresentam nonapeptídeos da proteína viral (164). A estrutura 3D do complexo MHC de classe I humano HLA-A2 foi determinada por difração de raios-X (165). O espaço de ligação dos peptídeos apresentados é regido por duas fitas paralelas  $\alpha$ -helicoidais conectadas por fitas  $\beta$  antiparalelas centrais. A ranhura do MHC, que é formada por estes domínios, constitui um receptor muito forte para a ligação dos peptídeos. Considerando que características globais das moléculas MHC são conservadas, os bolsões do sulco são polimórficos e variam entre as diferentes moléculas HLA para cada alelo individual. Estes peptídeos representam fragmentos do sistema de degradação endógeno de proteínas self em células saudáveis e podem representar fragmentos de proteínas virais definidos se a célula está infectado. Os linfócitos T são capazes de distinguir entre o self e o não-self no bolsão de ligação e destruir apenas as células infectadas. A eluição dos peptídeos a partir de moléculas de MHC de classe I e posterior seqüenciamento desta mistura oligopeptídeos (166-168) revelou que os tipos mais comuns de ligação aos nonapeptídeos usam posições de ancoragem específicas. Para o HLA-A2 o segundo aminoácido (Leu ou lie) e o nono aminoácido (Val ou Leu) são resíduos de ancoragem dominantes. Epítopos que podem ser alinhados com este parametro são, por exemplo, ILKEPVHGV de

transcriptase reversa do HIV (169) e GILGFVFTL da proteína da matriz do influenza (170). De forma análoga, os aminoácidos de ancoragem dos peptídeos que foram eluídos a partir de diferentes tipos e espécies de MHC de classe I foram determinados, tais como as formas humanas HLA-B27 , HLA-B8 e das formas em camundongos HL-2K b, HL-2K d, HL-2K k, HL-2K kin1 (171, 172). A modelagem molecular do MHC de classe I apresentando um nonapeptídeo alelo-específico revelou que as posições de ancoragem dos peptídeos para acoplamento exatos nos bolsos do sulco do MHC podem variar (173). O receptor em CTL é visto como filtro considerando a extrusão dos resíduos dos nonapeptídeos que não são cobertos pelas moléculas de MHC. Em estudos anteriores hélices anfífilas ou motivos particulares de 3 a 5 aminoácidos foram sugeridos para reconhecimento em células T (174). No entanto, com o conhecimento experimental das interações MHC-peptídeo não é surpreendente, que estes métodos de predição tenham atingido apenas um sucesso limitado. É, entretanto, mais racional para pesquisar os motivos comuns entre os conjuntos de peptídeos que se ligam às várias moléculas de MHC de classe I de moléculas. Com base no conhecimento de motivos de ligação com MHC , uma determinação exata de epítomos CTL será possível (175). Esta abordagem é aplicada com sucesso em diversos trabalhos com foco em desenho vacinal e tende a se tornar uma ferramenta de rotina para determinação de epítomos CTL porque para a maioria dos tipos de peptídeos ligantes HLA será determinada em breve. Usando o motivo de ligação HL-2Kd já identificados (-Y - I / L) Palmer e colaboradores (176) previram o peptídeo GYKDGNEYI como um epítomo CTL contra Listeria. Progresso experimental

semelhante permitirá a determinação rápida dos motivos motivos de epítomos de células T auxiliaadoras. Em contraste com misturas eluídas a partir de MHC de classe I moléculas, as misturas de peptídeos isolados de MHC classe II consistem de peptídeos de comprimento variável entre 12-23 aminoácidos. Novamente, há âncoramento de aminoácidos conservados, que estão envolvidos em um contato restrito com o MHC de classe II individual

O desenvolvimento de estratégias de síntese paralela para um grande número de peptídeos levou a uma nova era no mapeamento de epítomos. A caracterização dos determinantes antigênicos de uma proteína com peptídeos que abrangem a totalidade da sequência (177, 178) tornou-se possível não apenas para as proteínas pequenas, mas também para as maiores, com mais de 1000 resíduos. Estratégias diferentes foram elaboradas para atingir o objetivo da síntese múltipla de peptídeos, também chamada síntese de peptídeos simultânea. A síntese rápida de vários e até milhares de peptídeos em paralelo, cada uma compreendendo uma sequência diferente ou uma diferente região C-terminal foi chamada de spot synthesis. Estratégias manuais podem ser distinguidos de ferramentas automatizadas ou semi-automatizadas. E métodos que conduzem a polímeros ligados a peptídeos podem ser importantes para obter mais informação a partir das sequencias sintetizadas, aumentando o poder da técnica.

A primeira geração de síntese múltipla de peptídeos foi criada por Houghten (179). O método desenvolvido é adequado para a preparação de mais de 150



peptídeos em paralelo. A separação do suporte polimérico é conseguida por meio de selagem em recipientes de polipropileno líquido. Cada recipiente conduzirá a um distinto peptídeo durante o ciclo de síntese. Em um protocolo de síntese comum, 100 mg de poliestireno divinilbenzeno (1%) são seladas em recipientes com 3 × 4 cm, no entanto, recipientes maiores ou resinas diferentes podem ser utilizados como alternativas, desde que o tamanho dos polímeros se encaixe com os poros da trama. A desproteção do grupo  $\alpha$ -amino e os passos de lavagem são efetuados em conjunto para todos os peptídeos em frascos com tampa de rosca de polietileno, o tamanho dos quais pode ser ajustado dependendo do número de peptídeos e volume da lavagem. Para o acoplamento dos aminoácidos os recipientes são classificados de acordo para serem acoplados corretamente e reagirem em paralelo com o aminoácido ativado, em frascos separados. Após a remoção do solvente, os recipientes são lavados duas vezes separadamente e, em seguida, reunidas para as etapas de lavagem e desproteção. Em princípio, este método não é dependente da proteção ou da estratégia de acoplamento. Utilizamos neste trabalho a estratégia Fmoc, que permite o acoplamento não só mais rápido, mas também evita solventes halogenados (180). O método de tea-bag mencionando acima tem grandes vantagens em relação a outros métodos, com respeito ao baixo custo e alta flexibilidade. Principalmente por serem realizadas manualmente, quantidades relativamente grandes de peptídeos livres podem ser obtidos que podem ser utilizados para imunização, mas também a investigação de estrutura ou de atividade ou ainda em análises conformacionais.

Sintetizadores automatizados substituíram a complexidade das reações e procedimentos operacionais do método *tea-bag* com a inserção de muitos passos repetitivos popularizando a estratégia que anteriormente era impeditiva em muitos laboratórios. Durante a síntese múltipla, tal como em fase sólida comum a síntese de peptídeos depende da desproteção, lavagem e passos de acoplamento; que são repetidos em cada ciclo. Na segunda geração da síntese múltipla de peptídeos vários sintetizadores foram desenvolvidos e são agora comercialmente disponíveis. Princípios diferentes foram realizados a fim de obter máquinas que lidam diversas sínteses em paralelo. Robôs de pipetagem modificados são eficientes quando utilizados para a síntese múltipla de peptídeos automatizando o processo (181). A distribuição dos solventes, dos aminoácidos e dos reagentes é realizada com o uso de agulhas, que são controlados por um sistema diluidor. A resina para a síntese é pode ser em tubos ou em filtros. Para o sistema de tubo a remoção do solvente é obtida com uma segunda agulha, que é coberta com uma rede de platina, a fim de evitar contaminação da resina. Se o sistema de filtros é usado para a reação, um sistema de bombas é empregado e a remoção de os solventes é atingida através de sucção. Considerando que o segundo método é mais rápido e permite que uma maior quantidade de produto, menos problemas com as sequências que são difíceis de sintetizar foram encontrados no primeiro método (sem oxidação da metionina, sem lacunas de ar durante o acoplamento). Dependendo do tamanho dos tubos 48, 90 ou 144 peptídeos podem ser sintetizados em paralelo. O sintetizador múltiplo de peptídeos (Abimed AMS 422) também utiliza um robô. O

aparelho de um braço é controlado por um computador pessoal e é equipado com seis agulhas adicionais para a distribuição dos reagentes e pode ser usado para a síntese de até 48 peptídeos em paralelo. A síntese é realizada em filtros e a aspiração dos solventes é levada a cabo por meio de uma bomba de vácuo e válvulas de controle. A síntese automatizada, paralelizada, de oito peptídeos foi publicada por Nokihara (182). Os spots de reação, reservatórios e derivados de aminoácidos são fornecidos em oito faixas, cada uma das quais contém o conjunto completo para a síntese de peptídeos. O software pode ser adequado com respeito aos métodos de ativação diferentes e as escalas dos peptídeos a serem sintetizados. No entanto, o número de peptídeos é limitado a oito. Até agora, a síntese múltipla, paralelizada e automatizada por robôs, só é possível com a estratégia Fmoc. Spots abertos proíbem a utilização de ácido trifluoroacético em cada ciclo, como era necessária para a estratégia de Boc. A antigenicidade e imunogenicidade da vacina contra a proteína de superfície P6 de *Haemophilus influenzae* tipo b foi investigada por síntese paralela usando vinte e quatro 20meros de lipopeptídeos e quarenta e cinco 12meros de lipopeptídeos. O mapeamento da nucleoproteína da do vírus da gripe foi conseguido usando sistemas automáticos de robôs 350 (Zinsser Analytics) (138, 183, 184). As figuras 8 a 10 representam esquematicamente os passos seguidos pelo equipamento para a síntese dos peptídeos.

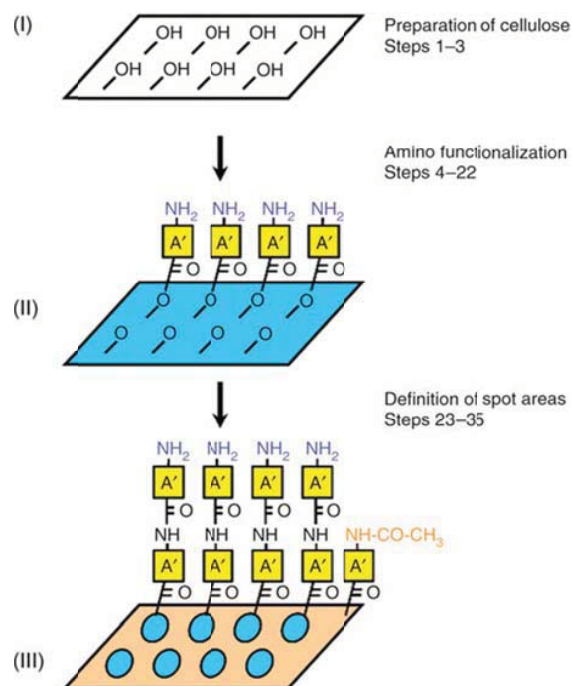


Figura 8: Preparação das membranas para síntese paralela de peptídeos. Passo de fixação dos peptídeos à membrana: (I) Membrana de celulose não tratada, com os grupos hidroxila reativos disponíveis (OH). (II) grupos hidroxila foram esterificados com os grupos carboxílicos com alanina protegida por Fmoc. Após desproteção de Fmoc, de uma camada de  $\beta$ -alanina (A') ligada à celulose. Os grupos amino livres são então corados com BPB, como está simbolizado pela cor azul da membrana de celulose e dos grupos  $NH_2$ . (III) em pontos distintos, uma segunda alanina protegida com Fmoc é depositada sobre a celulose, definindo as zonas para a síntese peptídica. Seguindo a acetilação de todos os grupos amino livres, desproteção Fmoc e coloração com BPB, apenas os pontos onde a segunda alanina teve sido êxito na incorporação apresentam coloração azul. Os grupos amino acetilados são mostrados em laranja (185).

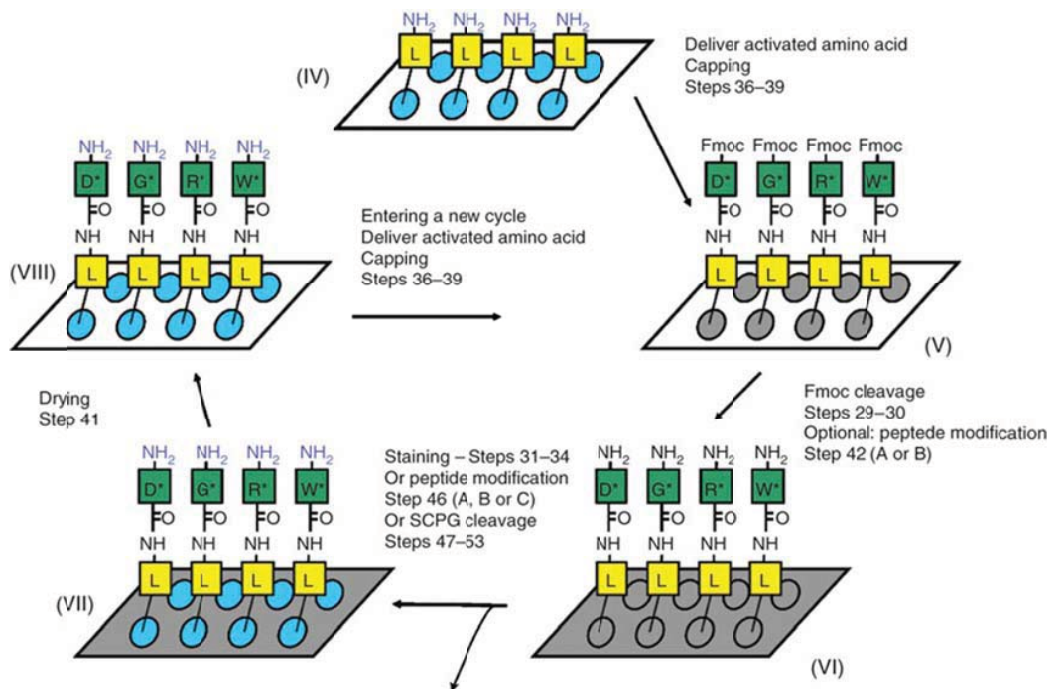


Figura 9: Preparação das membranas para síntese paralela de peptídeos. Passo síntese controlada dos peptídeos em membrana: (IV) O ligante na membrana, composto por duas alaninas é representado como "L" dentro de uma caixa de cor amarela. (V) em cada local, o próximo aminoácido necessário, protegido por Fmoc, é fornecido, como simbolizado na caixa de cor verde com o código de uma letra para os aminoácidos. A estrela refere-se os grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos. As áreas cinzas indicam que ponto as soluções dos ácidos aminados são utilizados. (VI) A desproteção de Fmoc com piperidina liberta grupos amino para o acoplamento do aminoácido seguinte. A cor cinza indica que a membrana é tratada com solventes. (VII) Os grupos amino livres são corados com BPB (indicada pelos pontos azuis). (VIII) A membrana de celulose é seca (indicado pela cor branca) e as manchas são quantificadas. (185).

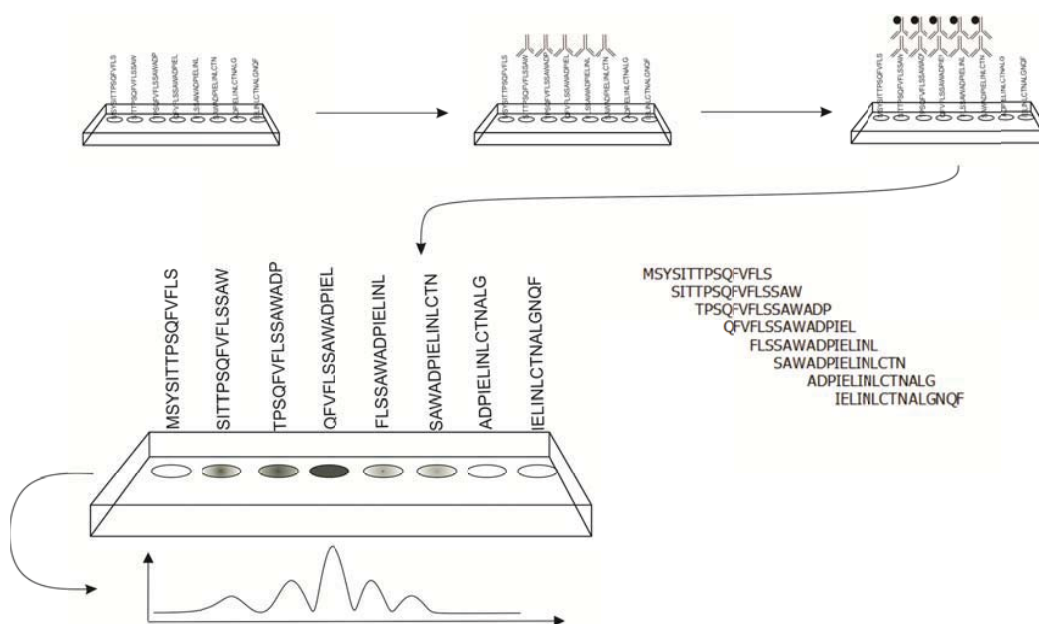


Figura 10: Representação esquemática dos peptídeos sintetizados fixos à membrana e em processo de identificação imunológica seguida de revelação mediada por anticorpos conjugados com fosfatase alcalina e posterior quantificação digital realizados neste trabalho.

A síntese de polímeros de peptídeos ligados a membranas desenvolvido por Geysen (186, 187) inseriu um conceito para a síntese de várias centenas de peptídeos em polímero sólido varas. Os peptídeos devem permanecer ligados ao transportador após a síntese para os ensaios biológicos. Apenas a cadeia lateral dos grupos protectores é removida. Hastes de polietileno amino-funcionalizadas (quatro mm de diâmetro, 40 mm comprimento) são empregadas como suporte. Estes suportes são montados sobre um bloco em oito linhas de 12 hastes cada. Os pinos deste arranjo encaixam exatamente em poços de placas de ELISA. Lavagem e desproteção são realizadas rapidamente e o acoplamento é realizado em placas de ELISA. A quantidade e distribuição dos aminoácidos Fmoc acoplados é calculada por um programa de computador. Uma vez que as hastes

de polietileno sofrem alterações, os passos de lavagem podem ser realizados completamente. Em outra opção, cabeças destacáveis dos pinos e não das hastes são funcionalizadas. Os blocos podem ser usados várias vezes. A fim de obter peptídeos livres pelo método de síntese com pinos, vários métodos são conhecidos. Reações químicas de clivagem enzimática são engenheiradas na estrutura dos aminoácidos e introduzidas em sequências C-terminais (Asp-Pro-Gly permite clivagem ácida, Lys-Gly permite a clivagem triptica (188); Lys-Pro permite formação dicetopiperazina (189). Isto permite a síntese controlada dos peptídeos. No entanto, as quantidades de peptídeos livres são limitadas, aproximadamente 10-300 nmol por haste. Este método de síntese de peptídeos em barras é usado principalmente em ensaios ELISA. Muitas investigações sobre mapeamento de epítomos de proteínas ou de identificação de os sítios de ligação de anticorpos monoclonais ou de soro foram publicadas com estes métodos. Os anticorpos a serem testados são distribuídos em placas de ELISA, e os peptídeos ligados às hastes incubadas em conjunto. Os anticorpos específicos correspondentes nos soros de ligam-se ao peptídeo possuindo a sequência do epítomo de células B linear fixo à haste. Incubação do complexo anticorpo- peptídeo com um anticorpo secundário marcado enzimaticamente produz o sinal colorimétrico. As aplicações típicas são o mapeamento de grandes proteínas por sintetização de sobreposição de tetra a pentadecapeptídeos contra ensaios com antisoros ou anticorpos (187).

O mapeamento fino de epítomos em anticorpos neutralizantes contra o a proteína pre-S de do vírus da hepatite B conduziu à identificação de uma sequência de 14 resíduos em que dois deles (Gin, Trp) foram descritos como

cruciais (190). Outras investigações bem-sucedidas de sítios de ligação de anticorpos são relatados para proteína VPL do vírus da febre aftosa (187), a proteína capsular do vírus de Epstein-Barr também mapeada com 1381 aminoácidos (162). Várias proteínas de subtipos HIV (191-197) e também do objeto deste estudo, com o TMV (198) foram mapeadas utilizando a tecnologia das hastes. Considerando que a pesquisa de anticorpos monoclonais frequentemente pode ser atingida por protocolos de rotina os mapeamentos por este método não são completos. Uma vez que os peptídeos sintéticos podem cobrir muito precisamente a seqüência da proteína inteira com apenas um aminoácido deslocado para cada péptido, epítomos de células B são identificados com muita precisão. Um procedimento de baixo custo para a preparação de polímero ligados a peptídeos foi introduzido (136, 137). Folhas de papel membrana são utilizadas como polímero. Gotículas de líquido são aplicadas sobre a membrana cuja propagação ao longo de uma área circular restrita (spot). Esta chamada síntese local permite a síntese em paralelo de cerca de 50 peptídeos sobre uma folha de papel (55 x 105 mm), isto porque um grande número de spots distintos são distribuíveis e cada um destes pontos permanece individualmente endereçável. Os passos da síntese de peptídeos são realizados por imersão da membrana de papel em conjuntos com os respectivos reagentes ou solventes.

Para o acoplamento dos aminoácidos são dispensados nos pontos definidos tipicamente 5 a 10 / ul. A miniaturização é sugerida para acomodar o a síntese de peptídeos por 100 / cm<sup>2</sup> (137). Depois a síntese continua com a remoção dos protetores de cadeia lateral dos grupos dos aminoácidos, os



peptídeos permanecem ligados ao de papel e são testados num ensaio de Western-blot ou as manchas são cortadas e clivadas separadamente por um ligante introduzido antes da síntese. A precisão e eficiência do método são determinantes, no entanto, o estabelecimento deste processo como rotina exige investimentos especiais na área.

#### **1.4 Alta pressão hidrostática**

Alta pressão hidrostática corresponde a um método que promove dissociação de proteínas oligoméricas e estruturas supramoleculares, tais como as partículas virais. Isso ocorre devido a uma diminuição no volume do sistema no processo de dissociação. No entanto, não se observa rompimento de ligações covalentes, havendo mínimas mudanças em estruturas secundárias e terciárias das proteínas envolvidas (199). Isso é de particular interesse na produção de novas vacinas virais, porque ao mesmo tempo em que a alta pressão promove a inativação viral, observa-se freqüentemente a manutenção de suas propriedades antigênicas e imunogênicas (200, 201). Outros métodos de produção de vacina apresentam limitações em relação à alta pressão, tais como inativação química incompleta, mudanças nas propriedades imunogênicas, eficácia variável e mutações. Mais recentemente vem ocorrendo um grande interesse no efeito da alta pressão hidrostática sobre a estabilidade e infectividade de diversos vírus. Já foram relatados vários exemplos de significativa inativação viral após aplicação de ciclos de pressurização e despressurização, muitas vezes em combinação com outros agentes físicos e/ou químicos (142, 202, 203). Essas abordagens têm sido

realizadas em áreas de interesse médico, veterinário, de alimentos e em pesquisa básica. Entre os vírus investigados, tem-se vírus da imunodeficiência humana (204), herpes simplex vírus humano e citomegalovírus humano (205), vírus da hepatite A (206) entre muitos outros.

A inativação de muitos dos vírus antes mencionados é alcançada com pressões um pouco inferiores que as atingidas em equipamentos comerciais utilizados para o processamento de alimentos. As pressões variam de 150 a 350 Mpa, no entanto os tempos de tratamento podem variar de 30 min a 8 h. No caso de vírus mais resistentes, a inativação por pressão pode ser alcançada utilizando-se também outros métodos físicos ou químicos. Para o vírus da febre aftosa, por exemplo, utilizou-se uréia (207) e para vírus do mosaico do tabaco, temperatura negativa (-18°), demonstrado no presente trabalho.

Nossos laboratórios, em conjunto, têm estudado a termodinâmica da dissociação e desnaturação viral para vírus do mosaico do tabaco (TMV), utilizando alta pressão hidrostática em várias condições experimentais (208). A figura 11 ilustra os equipamentos utilizados. Recentemente, foi mostrado que processos de dissociação viral e de proteínas, quando facilitados por aumento de pH têm como base a liberação estequiométrica de prótons, sugerindo tratar-se de um mecanismo geral da dissociação (48, 209). O processo de dissociação induzida por uréia também foi descrito como combinação estequiométrica desse composto com o TMV. Além disso, foi observado que o processo de desnaturação desses vírus por uréia pode também ser quantificado como combinação

estequiométrica de uréia por mol de subunidade capsídica (210). Estudos anteriores mostram que processos de dissociação e desnaturação induzidos por uréia em vários vírus e/ou capsídeos isolados também podem ser descritos como reações estequiométricas dos mesmos com a uréia (210).

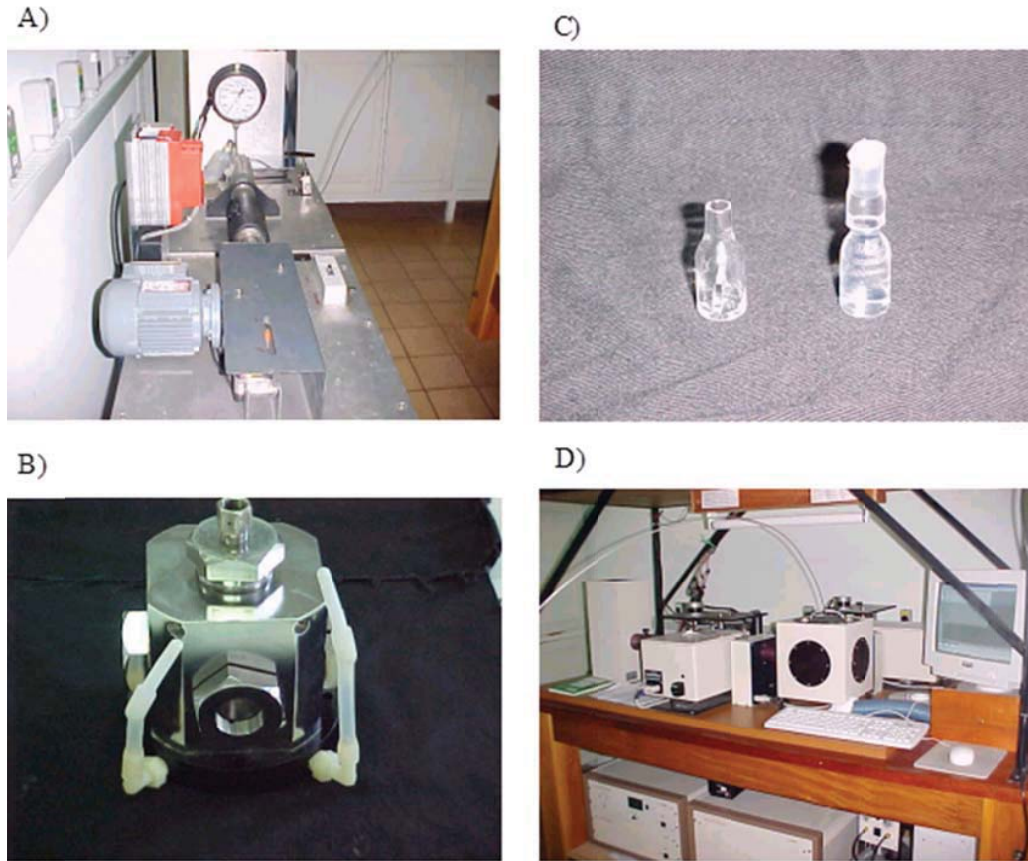


Figura 11: (A) Foto do gerador de pressão. (B) Foto da câmara de pressão onde são colocadas as cubetas para realização dos experimentos, mostrando as janelas por onde passam os feixes de luz para realização das medidas espectroscópicas e as mangueiras onde é conectado o sistema refrigerador. (C) Foto das cubetas de quartzo, uma dividida ao meio utilizada para os experimentos de microscopia sob alta pressão, sem ser selada (lado esquerdo) e a outra selada com tubo plástico de polietileno usada nos demais experimentos (lado direito). (D) Foto do fluorímetro e do computador, responsável por executar uma série de funções automatizadas – Imagens cedidas pelo Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP.

Utiliza-se inúmeras técnicas para avaliar os efeitos que a alta pressão causa na estrutura dos vírus alterando sua infectividade sem, no entanto, diminuir sua antigenicidade. Uma série de estudos (211-213) avaliou a integridade da estrutura de capsídeos virais após tratamentos com alta pressão. Para o vírus da estomatite vesicular (VSV), Silva e colaboradores (1992) relataram o aparecimento de protuberâncias nas superfícies virais tratadas com pressão. No caso dos rotavírus SA 11-4S, a morfologia geral mostrou-se com poucas alterações em incubação a 250 Mpa por 1 hora.

Observou-se nesses vírus uma descontinuidade no capsídeo, sugerindo que o tratamento com pressão causa um “descolamento” do contato da camada externa com a interna, que permaneceu intacta, protegendo o RNA viral de tratamentos com RNase (212).

#### 1.4.1 **Equipamento de alta pressão hidrostática**

O sistema utilizado consiste de um gerador de pressão conectado à câmara de pressão hidrostática. No interior da câmara colocou-se uma cubeta cilíndrica de quartzo com volume de aproximadamente 1,2 mL contendo a amostra de TMV a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão (etanol), a cubeta foi selada com um tubo de polietileno cuja extremidade foi fechada por aquecimento. Esse tubo colapsado permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra dentro da cubeta, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos. A cubeta foi fixada em uma base cilíndrica metálica para evitar o movimento desta no interior da bomba. A

amostra permaneceu sob temperatura controlada. As incubações do TMV foram feitas a temperatura controlada de 20 °C e -18 °C a pressões de até 350 Mpa.

Os vírus são muito diferentes de outros seres biológicos em termos de estrutura e atividades intra e extra-celulares. Vírus podem constituir de apenas um capsídeo protéico formado por subunidades de proteínas que envolvem seu material genético (DNA ou RNA). Alguns vírus também podem conter enzimas necessárias à sua replicação nas células hospedeiras. Entre vírus existe um elevado grau de diversidade estrutural e isso se reflete na ampla gama de resistência à pressão entre estes organismos (202, 204, 205, 207, 211).

A inativação viral por alta pressão ainda não está completamente esclarecida embora o envelope viral, quando presente, pareça ser um alvo para a inativação. A maioria dos estudos com alta pressão tem sido realizada com vírus envelopados. Neste caso, a alta pressão pode afetar três tipos de interações: proteína-lipídeos, proteína-proteína e proteína-ácido nucléico (214). Após o tratamento de alta pressão a estrutura global dos vírus não é alterada e a única diferença perceptível, com auxílio de microscopia eletrônica, é a existência de protuberâncias na superfície que podem ser explicadas por um deslocamento das subunidades do capsídeo mantidas sob a membrana de lipídeos e proteínas (202, 214). A figura 12 representa as alterações previstas em uma proteína quando submetida a tratamentos físico-químicos.

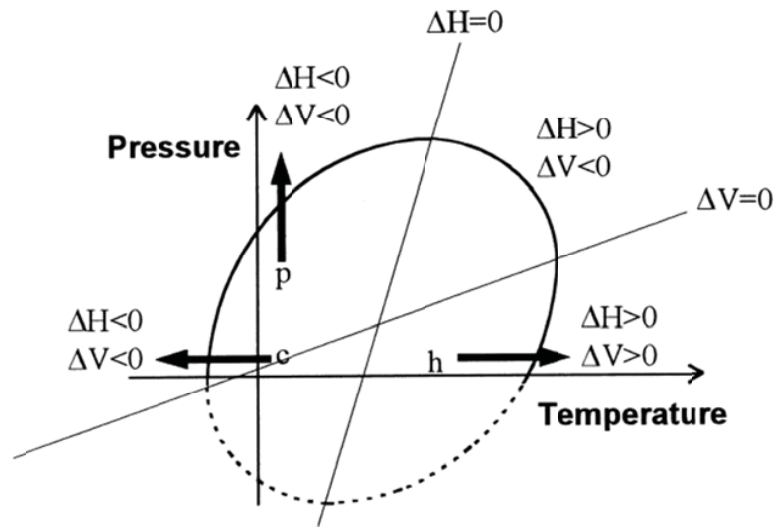


Figura 12: representação esquemática das alterações em entalpia e volume da proteína quando tratamentos físico-químicos são aplicados à estrutura (215).

Essas mudanças sutis na conformação das proteínas virais do capsídeo ou das glicoproteínas do envelope induzidas pela alta pressão, mimetizam o processo de ligação das partículas virais aos receptores celulares, o chamado estado de "fusão-ativa", já que ele não se consolida (214). A transição para o estado fusogênico impede a ligação dos vírus aos seus receptores celulares e, portanto, a endocitose, quando for o caso, evitando dessa forma a infecção da célula hospedeira pelos vírus (202).

Vírus não envelopados são geralmente mais resistentes à pressão do que vírus envelopados. O estado fusogênico descrito para vírus com envelope também pode ser encontrado naqueles não envelopados inativados por tratamentos com alta pressão. Propôs-se que, quando submetidos à alta pressão, capsídeos virais desestremem e, ao retornarem à condição não pressurizada, ocorreria a

reassociação das proteínas do capsídeo viral em uma forma não-infecciosa, semelhante ao estado de fusão intermediário descrito para vírus envelopados (202, 204, 214, 216)

Essa inativação é frequentemente reforçada quando o tratamento com alta pressão é aplicado em temperaturas abaixo de zero. Nestas condições, as proteínas do capsídeo sofrem desnaturação devido a uma quebra da sinergia entre as ligações de hidrogênio dos grupos hidrofóbicos, levando à perda de estruturas quaternárias e terciárias (48, 209, 211).

Tratamento com pressões superiores a 300 MPa provocaram danos aos envelopes do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e citomegalovírus (CMV), impedindo sua ligação às células (205). A pressão também causa a dissociação de partículas virais e, dependendo dos vírus e das condições de tratamento, a dissociação pode ser totalmente reversível ou irreversível (210, 217).

#### **1.4.2 Aplicação da alta pressão no desenvolvimento de vacinas**

Agentes patogênicos inativados por pressão são capazes de estimular o sistema imunológico e, portanto, podem ser usados para a produção de vacina. O efeito da alta pressão sobre proteínas provoca um desdobramento nas estruturas terciária e quaternária expondo sítios antigênicos e imunogênicos (202, 207).

Os primeiros ensaios sobre a capacidade de parasitas pressurizados provocarem uma resposta imune foram realizados no protozoário *Eimeria*

*acervulina*. Foi demonstrado que em frangos inoculados com oocistos desse parasita, tratados com alta pressão, as lesões desenvolvidas eram menos graves do que naqueles inoculados com o parasita não tratado, indicando que pode ter sido desenvolvida uma imunidade parcial após o desafio com o parasita tratado com alta pressão (218). O efeito de alta pressão sobre a imunogenicidade de bactérias foi reportado pela primeira vez por Silva e colaboradores (2001). Após ter sido inativada com tratamento por alta pressão a bactéria *Leptospira interrogans* quando injetada em coelhos foi capaz de provocar uma importante resposta imune, medida pela titulação de anticorpos. Essa resposta provavelmente pode ser explicada pela aparição de novos epítopos, surgidos pela extrusão parcial de proteínas da membrana ou a dissociação oligomérica da proteína integral de membrana (212).

Vacinas antivirais preparadas a partir de vírus inativados por diferentes processos apresentam algumas desvantagens em relação àquelas obtidas por inativação por alta pressão tais como o risco de inativação incompleta, a toxicidade do agente inativante e modificações das propriedades imunogênicas dos vírus (202). Como a alta pressão hidrostática não introduz substâncias exógenas na vacina e, frequentemente é seletiva na ação sobre as estruturas macromoleculares, seu uso resulta, em geral, em preparações altamente imunogênicas (210, 217, 219).

Tem sido demonstrado que vírus tratados com pressão perdem sua infectividade, mas ainda conservam sua capacidade de produzir anticorpos



neutralizantes. A hipótese mais aceita é que sob alta pressão as proteínas do capsídeo viral se dissociam e quando a pressão é liberada do sistema, a reassociação do capsídeo ocorre na forma de partículas não infecciosas que ainda conservam as suas propriedades imunogênicas (208, 210, 212, 216, 217, 220). Além disso, os epítomos previamente ocultos podem ser expostos, aumentando a imunogenicidade dos vírus inativados por pressão. Comparada à vacina tradicional, a produção de vacinas sob alta pressão apresenta muitos benefícios, incluindo um menor risco de desenvolver a doença em relação às vacinas atenuadas e uma provável maior imunogenicidade das subunidades virais isoladas (202, 207, 210, 212, 216, 217, 220, 221). A figura 13 ilustra as alterações conformacionais induzidas por pressão em uma proteína viral.

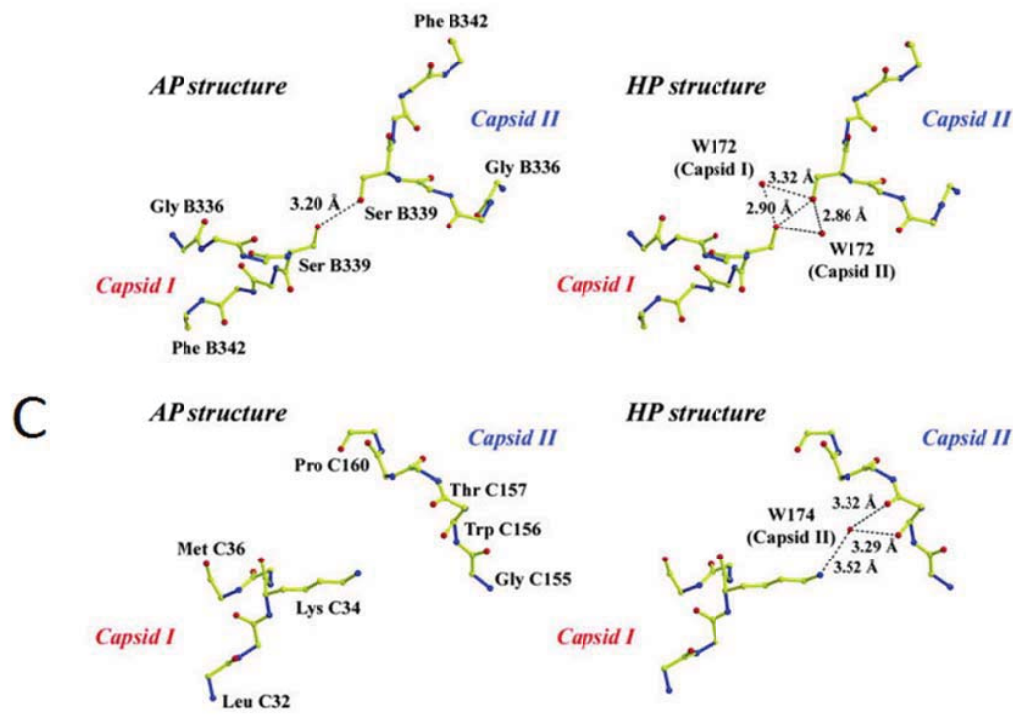
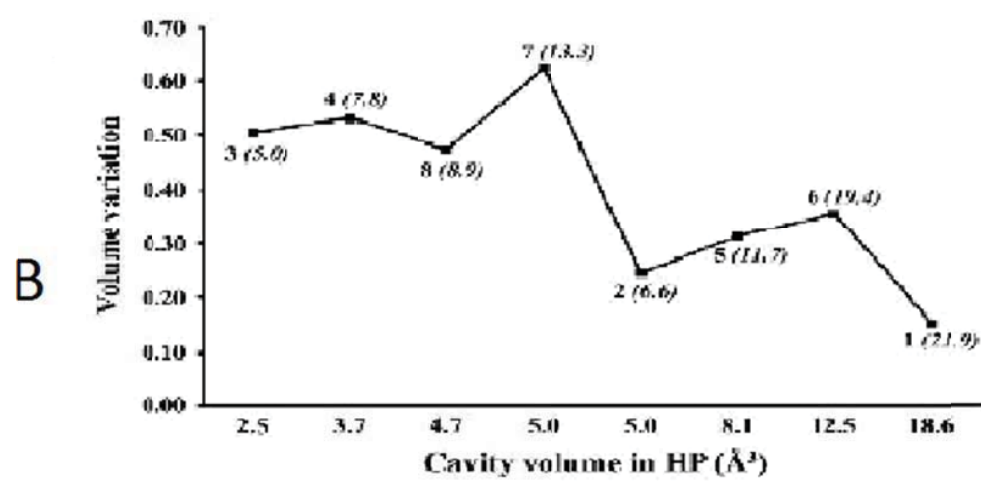
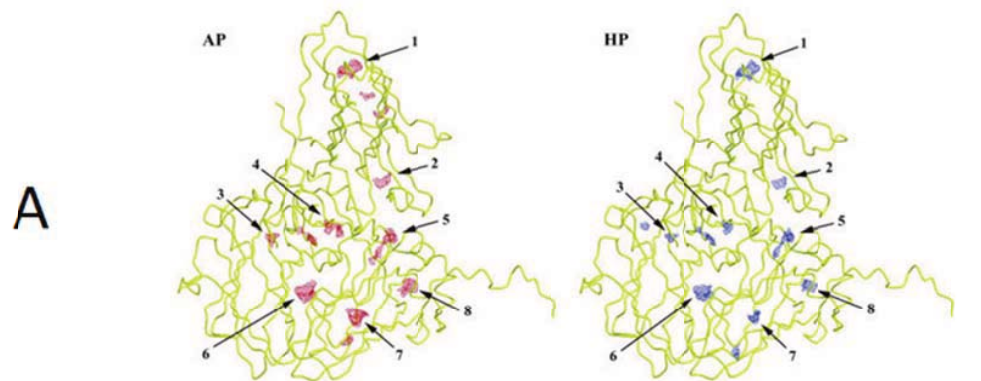


Figura 13 Alterações induzidas por pressão na estrutura da proteína do capsídeo do Cowpea Mosaic Vírus (CPMV), evidenciando exposição e oclusão de aminoácidos após o tratamento com 330 MPa. A: Alterações induzidas por pressão induzidas nas cavidades do CpMV. Esta figura mostra a cópia reorientada com volumes das cavidades mais próximas aos valores médios obtidos, AP – Pressão Atmosférica, HP – Alta Pressão. B: A variação do volume da cavidade entre AP e HP como uma função do volume médio de HP. Números da curva representam o número da cavidade e do volume médio da cavidade em AP (em itálico, entre parênteses). C: Alterações no empacotamento do cristal, devido à alta pressão. Cb: domínio de interação, Cc: zona de interação com o domínio C (222).

## 1.5 Bioinformática

A análise detalhada dos epítomos alvo por células T autorreactivas e autoanticorpos tem uma importância considerável na investigação e desenvolvimento imunopatológicas, bem como na concepção de novos instrumentos de diagnóstico, drogas terapêuticas e vacinas. O percurso em direção ao alinhamento dos sistemas computacionais e mecanismos imunobiológicos é recente (149, 175, 223-230), mas já com resultados muito interessantes (231-236). Condições estas iniciais para justificar o desenvolvimento de metodologias de previsão *in silicio* de estruturas proteicas, entre muitas outras aplicações. Eficientes e finas técnicas de mapeamento moleculares são necessárias para a melhor compreensão da relação entre a estrutura das biomoléculas e possíveis funções (237). As inovações nas técnicas de microarranjo são controversas ainda – dado o volume de informações por elas geradas – mas são capazes de analisar diferentes personagens submoleculares e combiná-los com funções biológicas. O desenvolvimento do poder de computação e juntamente com algoritmos para analisar dados biológicos aumentou a eficiência do laboratório de pesquisa e diagnóstico durante a última década e, pelo uso de

ferramentas *in silicio* de pesquisa, o desenvolvimento de drogas ou vacinas tornou-se mais eficiente e, por consequência, rentável (238-241).

Diversos algoritmos estão disponíveis para cálculo do índice de imunogenicidade e de epítomos, prevendo com base em sequências de antígenos informações importantes para estudos imunológicos (224, 242-244). A maioria destas técnicas envolvem cálculos com base em tabelas de valores para os vinte aminoácidos que refletem a probabilidade de ocorrência na superfície de proteínas ou como parte de estruturas secundárias, tais como  $\alpha$ -hélices ou folhas beta. O mais bem sucedido destes algoritmos utiliza escalas relacionadas com a solubilidade em água dos aminoácidos individuais na previsão de características de hidrofobicidade da proteína. Em particular, as maiores taxas de sucesso são obtidas usando as escalas hidrofobicidade que enfatizam os aminoácidos carregados e polares, mas não são excessivamente seletivas, quer para as cargas positivas ou negativas. Tal método pode identificar corretamente locais antigenicos importantes das proteínas para a maioria dos organismos infecciosos caracterizados (148, 245). Os mecanismos modelados computacionalmente são representados no ambiente celular na figura 14 para MHC classe I e na figura 15 para MHC classe II.

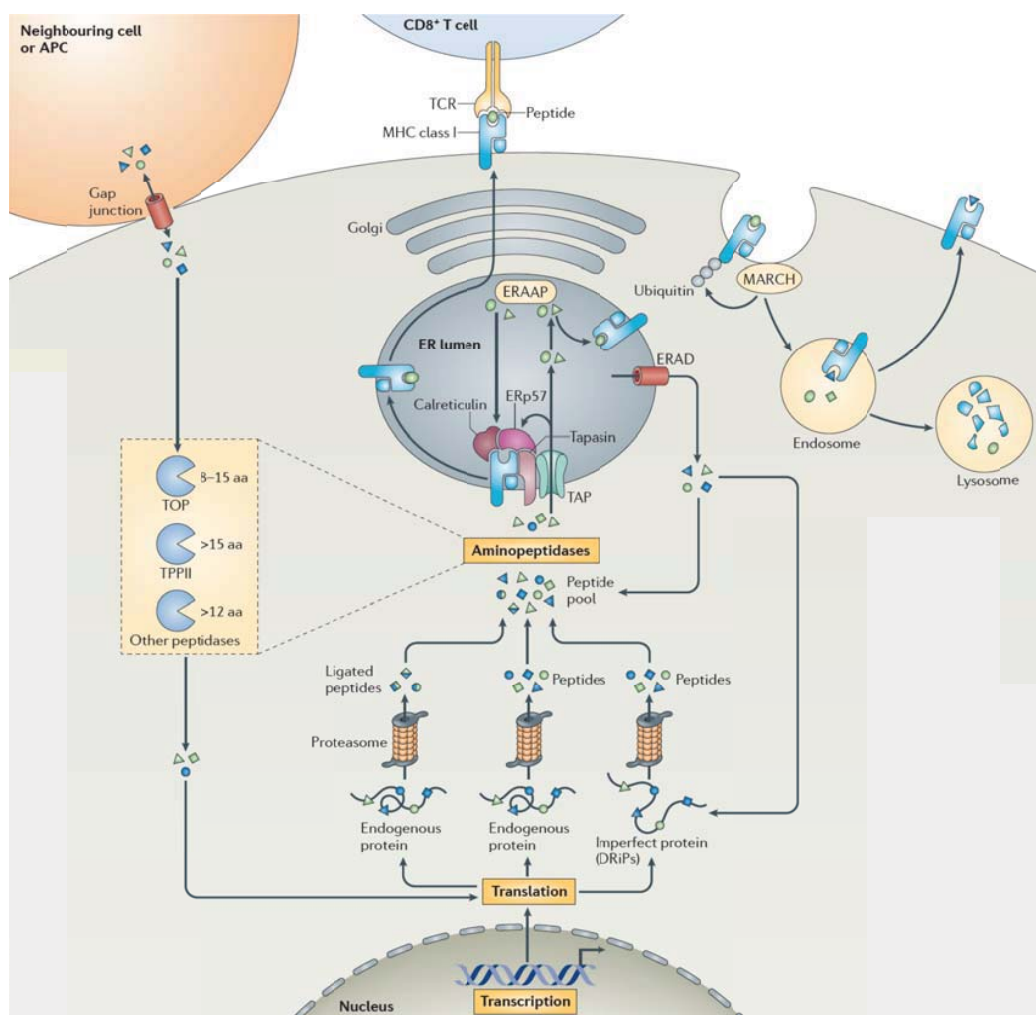
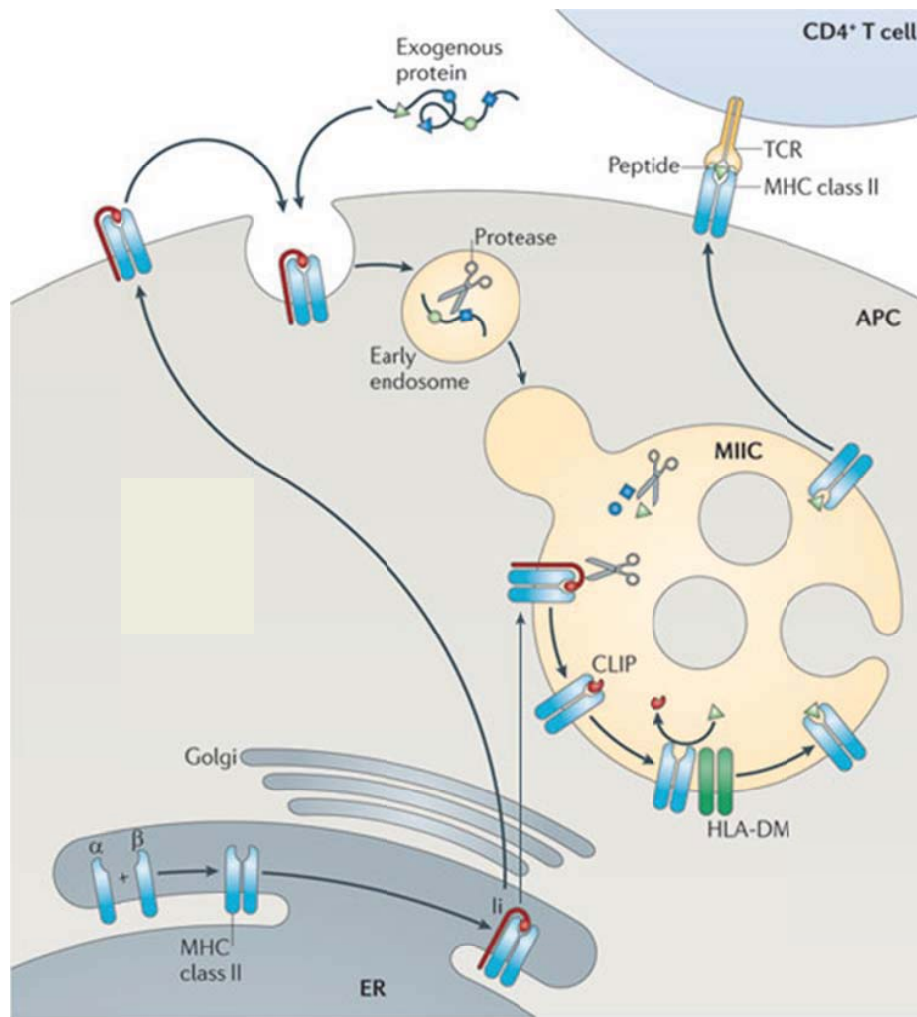


Figura 14: Mecanismos de processamento, apresentação e comunicação celular para interpretação via MHC classe I de antígenos. O processamento antígenos começa já com a transcrição e tradução. Muitas proteínas são feitas de forma imperfeita, designadas por produtos defeituosos. De uma maneira semelhante a proteínas endógenas funcionais, são degradadas pelo proteassomo no núcleo e no citoplasma. O proteassomo pode, assim, gerar novos antígenos não codificados geneticamente. Os peptídeos resultantes são substcamundongos para aminopeptidases citosólicas, como a peptidase tripeptidil II (TPPII), que cortar e destrói a maioria dos peptídeos. Uma pequena fração de peptídeos pode escapar à destruição e portanto a translocação para o lúmen do retículo endoplasmático (ER) através do transportador associado com a apresentação de antígenos (TAP), que faz parte do complexo de carregamento de peptídeos (PLC; que, portanto, contém moléculas MHC classe I, ERp57, calreticulina e tapasina). Peptídeos podem então se ligar a moléculas MHC classe I diretamente ou podem exigir mais cortes aminopeptidases associadas com processamento de antígenos (ERAAP) no ER antes de serem considerados adequados para o MHC classe I, dentro ou fora do PLC. Os complexos peptídeo-MHC de classe I são, em seguida, liberados do PLC e do ER e são transportadas para a membrana para a apresentação a células T CD8 + (163).

Observa-se atualmente a permeabilidade das ferramentas de bioinformática com pouco espanto. Em termos de desenho de drogas - incluindo o desenvolvimento de vacinas – mecanismos eficientes para seleção de moléculas candidatas para novos medicamentos, melhores em todos os campos de tratamento; na prevenção de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes; bioterapias para câncer; transplante de órgãos; e no estudo de doenças auto-imunes (226, 246-251).



Nature Reviews | Immunology

Figura 15: Mecanismos de processamento, apresentação e comunicação celular para interpretação via MHC classe II de antígenos. As moléculas de MHC de classe II são constituídas cadeias por  $\alpha$  e  $\beta$  montadas no retículo endoplasmático (ER) e formam um complexo com a cadeia invariante (Ii). Proteínas endocitadas são degradadas por proteases residentes no processo de apresentação via MHC II. O fragmento peptídico Ii associado à molécula de MHC classe II (CLIP) permanece na cavidade de ligação ao peptídeo do MHC e é trocado por um peptídeo antigênico, com a ajuda da molécula auxiliar específica do alelo envolvido (como H2-M, em camundongos). Moléculas de MHC de classe II são então transportados para a membrana para apresentar os peptídeos antigênicos para células T CD4 +. APC, células apresentadoras de antígenos, TCR, receptor de célula T (163).

A premissa de prever um epítipo através de um programa *online* é muito distante da realidade laboratorial, capaz de desenvolver anticorpos monoclonais específicos com a imunização (138, 139, 252, 253). Mas a pesquisa de vacinas com base em genomas abriu novos potenciais problemas para a seleção dos antígenos alvo, usando em predições *silico* para análise dos genomas em conjunto com técnicas recombinantes para expressar os fragmentos de antígenos potenciais (254, 255). Diagnóstico laboratorial, design de drogas e desenvolvimentos de vacinas são áreas de biotecnologia médica atual de interesse crescente, onde as técnicas de computação desempenham um papel essencial.

O nosso objetivo principal foi o de comparar e avaliar os dados de mapeamentos de epítopos por membranas de epítopos lineares em em condições desnaturantes para o antígeno com predições *in silicio* que considerem o modelo e as condições estudadas. Com os resultados de medições imunoenzimáticas *in vitro*, em um modelo animal bem caracterizado, objetivamos inferir diferenças observadas em nível do processamento da proteína do capsídeo do TMV antes e após o tratameto de alta pressão hidrostática sobrepostas às semelhanças observadas entre o mapeamento da forma nativa e as previsões imunoinformáticas – calibradas para as condições usadas.

Diversas ferramentas *online* foram empregadas para mimetizar as vias de processamento de interesse, uma de grande importância é o IDEB. O objetivo do *Immune Epitope DataBase* (IEDB) (229) é catalogar e organizar as informações



relacionadas com epítomos de células T e de células B, bem como fornecer informações para prever epítomos novos e analisar epítomos conhecidos ampliando a base com novas informações sobre eles. O site IEDB é atualizado continuamente com base no feedback do usuário, resultando em versões fundamentalmente revistas do banco de dados em si (256) bem como das ferramentas hospedadas nos recursos associados de análise. O uso contínuo do banco de dados e ferramentas ampliou nosso entendimento de que as aplicações são possíveis e refinou a metodologia para alcançar melhores resultados.

Enquanto um conjunto similar de dados e ferramentas existem para epítomos B apenas as informações relativas a inferências possíveis dentro dos experimentos de mapeamento são consideradas neste trabalho, estão fora do escopo deste texto análises de dinâmica molecular. Além disso, os detalhes do processo de curadoria utilizados para capturar os dados da literatura, o desenvolvimento de uma ontologia formal para representar os dados de epítomos (257) e todas as ferramentas de previsão e de análise disponíveis (229) são descritos em detalhe em outros relatos. Nós aqui apresentaremos um breve resumo dos recursos atualmente disponíveis que estão relacionados epítomos de células B e T aplicadas ao objetivo deste trabalho.

Várias aplicações podem se beneficiar da identificação de epítomos em células T e / ou B, incluindo o desenho de vacinas profiláticas (258), terapêuticas (238), ferramenta populacional para a pesquisa (259) e de imunização (256). Projetar vacinas contra agentes infecciosos é a aplicação mais freqüente que pode

se beneficiar do conhecimento de células T epítomos. Basicamente, para uma vacina para induzir a criação de uma população de células de memória células T capazes de reconhecer o agente patogénico processado têm de interagir para estabelecer a comunicação imunológica necessária. Uma vacina, portanto, tem que conter epítomos de células T derivados deste agente patogénico. Isto não significa que a própria vacina tem de ser constituída por epítomos individuais, mas minimamente que os antígenos que abrigam os epítomos são inclusos. No caso da terapêutica (por vezes também chamada vacinas terapêuticas), o objetivo é o de modular uma resposta imune que, se existente, precisa de ser reforçada (cancro, infecção crónica), ou mesmo reduzida (doenças auto-imunes, alergia). Novamente, tal concepção terapêutica requer conhecimento objetivo dos epítomos de respostas em células T às quais se almeja modular. Para o diagnóstico, o objetivo é identificar se um paciente entrou em contacto com certos antígenos, a fim de ajudar a identificar as possíveis progressões clínicas auxiliando na definição de condutas. A utilização de epítomos como diagnósticos tem o potencial para distinguir as infecções com patógenos relacionados, condição pode ser complexa quando depende de um organismo inteiro ou preparações de antígeno, que pode muitas vezes ser reconhecido de forma cruzada – como é o caso do TMV deste trabalho. Finalmente, uma aplicação importante de epítomos de células T é a sua utilização direta como ferramenta para a pesquisa de bases de dados, uma vez que permitem rastrear HLAs específicos de populações de células T humanas.

Como mais drogas à base de proteínas são desenvolvidas, minimizar a imunogenicidade destas drogas torna-se outra importante aplicação dos

mecanismos de identificação de epítomos de células T. O termo 'de-imunização' foi cunhado para referir a um conjunto de tecnologias que reduzem a imunogenicidade através da remoção de epítomos de células T em proteínas terapêuticas. O processo implica primeiro na identificação de resíduos de ancoragem de epítomos no HLA de escolha, aplicando mutações pontuais a estes resíduos de ancoragem para aminoácidos neutros de tal modo que as mutações não interfiram com dobragem e função destas proteínas e, finalmente, na realização de validações para confirmar a ausência de imunogenicidade das proteínas mutantes (260). Os detalhes das ferramentas de identificação no IEDB de epítomos de células T focam neste problema, mas atualmente não existem ferramentas dedicadas no IEDB, por exemplo, que sugiram quais mutações em um fármaco proteico são recomendadas, até o momento.

Seguindo a descrição de recursos na IEDB, apresenta-se aqui exemplos de aplicações como o IEDB podem ser usados para 1) descobrir epítomos conservados em um antígeno novo, e 2) prever epítomos novos para facilitar a concepção de vacinas. Globalmente, nosso texto também visa fornecer exemplos de como os dados IEDB e das demais ferramentas aqui empregadas podem ser utilizadas de forma eficaz para aplicações práticas experimentais, e aborda questões mais comuns encontrados.

O banco de dados do IEDB fornece um catálogo de epítomos experimentalmente caracterizados em células T, bem como os dados sobre Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em experimentos de eluição

de MHC e de seus ligantes. Estes três tipos de dados experimentais diferem no que transmitem: Enquanto os dados de ligação a MHC mostram uma associação entre um ligante molecular (tipicamente um peptídeo) e uma molécula de MHC, os dados de eluição de MHC e dos ligantes mostra que o ligante eluído não é apenas capaz de se ligar uma MHC molécula, mas também foi capaz de passar pelos processos da maquinaria celular no que tange mecanismos de processamento de antígenos. De experiências em células T depositadas, por outro lado, é possível testar a capacidade destas produzirem um receptor de células T (TCR), que requer a ligação a uma molécula de MHC e consequente ativação. O IEDB representa as estruturas moleculares testadas para MHC, a eluição dos ligantes de MHC ou de células T, reconhecimento e os detalhes dos contextos experimentais em que estas moléculas foram testadas e posteriormente incorporadas. Apenas os peptídeos nos quais houve validação experimental de ligação que o algoritmo incorpora o dado como valor verdadeiro, enquanto que os que são positivos apenas para um ensaio de ligação são referidos como 'agentes ligantes de MHC' e aqueles que podem ser eluídos a partir de preparados de MHC da superfície celular são interpretados como ligantes naturalmente processados. Epítopos reconhecidos em seres humanos, primatas não-humanos, roedores, porcos, gatos e todas as outras espécies hospedeiras testadas estão incluídas no IEDB. Além disso, ambos os resultados positivos e negativos experimentais são mantidos na base. Por último, o âmbito da base de dados até o momento é incluir dados relativos à epítopos derivados de doenças infecciosas. Em particular, os epítopos de HIV são explicitamente excluídos uma vez que podem ser

encontrados no banco de dados Los Alamos HIV Molecular Immunology (261). Um exemplo de fluxograma para predição de informações com base na sequencia da proteína é representado na figura 16.

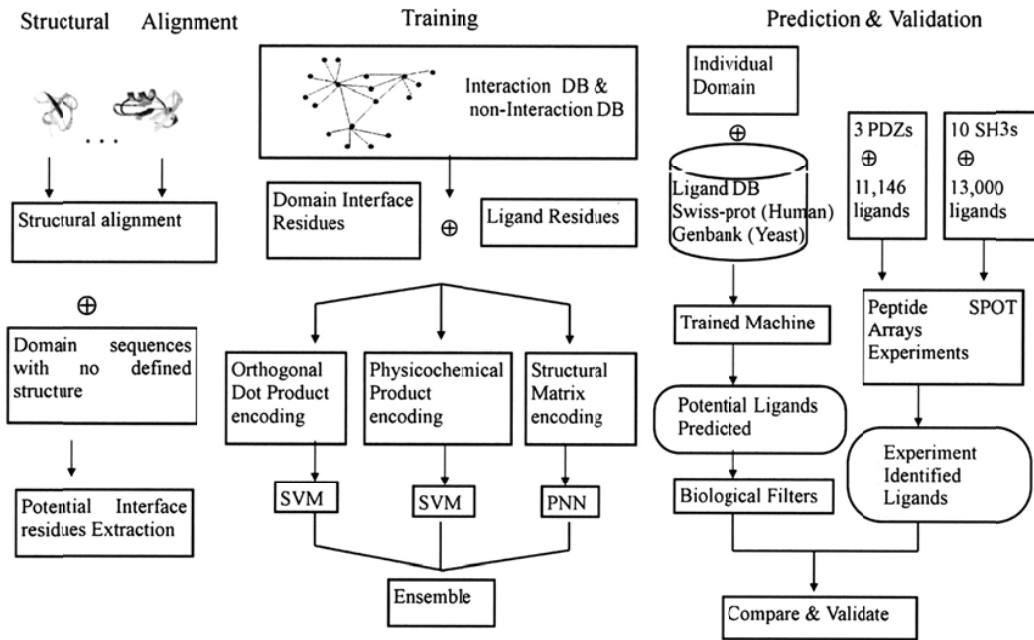


Figura 16: Fluxograma para predição de informações com base na sequencia de uma dada proteína.

Desde que o IEDB foi criado, os dados de 158.067 células T, 198.877 ligações ao MHC, e 2007 ensaios de eluição MHC-ligante foram coletados, quer através de curadoria manual ou observações diretas. Dados oriundos da literatura cobrem 99% de todos os artigos publicamente disponíveis em epítopos peptídicos mapeadas para agentes infecciosos (excluindo HIV) e 97,7% daqueles mapeados para alérgenos. Em termos de observações diretas, 194,862 ensaios foram apresentados por investigadores para o banco de dados do IEDB.

Complementando os dados imunológicos de epítomos determinados experimentalmente e contidos no banco de dados, o componente de recursos de análise fornece ferramentas para predição e análise de epítomos. As ferramentas de análise fornecem a capacidade de mapear epítomos na estrutura da proteína 3D do antígeno de origem, ou em seus homólogos (262), além dos epítomos de fragmentação em grupos com sequências semelhantes e também calcular o grau de conservação de epítomos em um dado conjunto de proteínas (263), ou prever a cobertura da população de um conjunto de epítomos com base na frequência dos alelos HLA (264).

As ferramentas de predição de epítomos de células T são divididas em ferramentas de predição de ligação e de processamento para afinidade MHC. A primeira categoria contém ferramentas que predizem afinidades de ligação de peptídeos, quer de MHC de classe I ou moléculas de classe II. Baseado em referências passadas métodos de previsão de ligação de MHC I, NetMHC-3.0 que usa algoritmos sustentados por redes neurais artificiais (ANN) e métodos de matrizes estabilizadas (SMM) que estão entre os melhores métodos de previsão em termos de desempenho individual e para MHC II, também ANN são mais eficientes e com melhor desempenho (244, 265, 266).

As previsões de processamento para classe MHC I combina as previsões obrigatórias descritas acima com previsões de clivagem proteossômica e transporte TAP, para identificar peptídeos que são naturalmente processados. Alguns estudos mostraram que os peptídeos de previsão são mais susceptíveis ao

reconhecido por células T do que aqueles selecionados por previsões de ligação ao MHC apenas (265, 267, 268). Por exemplo, no artigo por Kessler e colaboradores, um grande número de métodos de predição epítomos, disponíveis gratuitamente na internet para células T CD8+, foram testados contra uma lista de 64 peptídeos 9meros derivados a partir de um antígeno associado a um tumor conhecido. Dos 5 métodos testados nesta lista, apenas 4 métodos identificaram 2 de 3 epítomos reconhecidos como entre dez mais importantes para o problema em questão. O método de predição a partir dos algoritmos mencionados identificaram todos os 3. No entanto, nenhuma avaliação em grande escala foi realizada que claramente quantifica a vantagem de utilizar as previsões de processamento, que determinasse quantos epítomos são erroneamente preditos para não ser processados. Com base na literatura, a vantagem de utilizar previsões de processamento em detrimento das previsões de ligação – se houver – parece ser relativamente pequena. Além disso, qualquer vantagem deve ser comparada com o aumento da complexidade na interpretação dos resultados das previsões de processamento, especialmente quando a previsão epítomos de patógenos que evoluem para interferir com os componentes da máquina de processamento, evento não presente no sistema escolhido para este trabalho. Considerando que as teorias de seleção em vírus RNA (*Mueller's ratchet* e *Red Queen Hypothesis*) não podem ser aplicadas ao TMV neste desenho experimental.

Os vírus de RNA incorporam mutações rapidamente e, portanto, podem escapar à detecção de respostas imunitárias e de memória, permitindo infecções recorrentes no mesmo hospedeiro, por estirpes diferentes das mesmas espécies

virais. No entanto, em todos os vírus de RNA existem proteínas sobre as quais observa-se pouca alteração e grande conservação, evidentemente porque são fragmentos de alta relevância funcional e mutações implicam necessariamente em significativa perda de *fitness* quando não compensadas epigeneticamente. Sob esta ótica a identificação de epítomos que são conservados entre diferentes estirpes de uma espécie viral é de particular interesse. Para ambos os Dengue vírus (269, 270) e influenza (271, 272), epítomos de células T conhecidos e previstos foram analisados em termos de conservação para várias estirpes virais. Uma análise similar foi realizada para a cepa H1N1 em 2009 (273), trabalho que sondou especificamente epítomos que estavam também presentes em cepas circulantes recentemente, como a gripe sazonal. Para uma grande fração de epítomos de células T determinou-se a conservação na cepa pandêmica, e estes foram posteriormente validados experimentalmente como alvos de imunidade pré-existente em células T.

As ferramentas empregadas neste trabalho têm como plataforma paralela instrumentos matemáticos de aprendizagem baseada em evidências. As redes neurais artificiais (RNA) são algoritmos de computador modelados com base no mecanismo de decisão no cérebro. Consistem basicamente de muitas unidades de processamento simples, que são ligados entre si em uma rede de comunicações. Cada unidade é um modelo simplificado de um neurônio que envia um sinal de novo se receber um sinal de entrada suficientemente forte a partir de outras unidades às quais está ligado. A força destas ligações pode ser variada a fim de que a rede efetue um padrão desejado de sinal central, o que é aprendido a



partir de um conjunto de dados de treino. Os dados de treinamento neste caso são sequências peptídicas com diferentes afinidades quantitativas para uma dada molécula específica de MHC.

Muitas diferentes aplicações com redes neurais artificiais já existem para mensurar eventos biológicos. O modelo utilizado nesta tese foi inicialmente calibrado para previsões de ligação HLA-A2 por Nielsen e colaboradores (274) e tem sido aplicada a uma grande variedade de alelos inclusive para predição com alelos de camundongos, como é o caso para a linhagem Balb/C, cujos alelos Kd, Dd e Ld (MHC I) e IAd e IEb (MHC II) foram confrontados com a TMVcp.

A média de ligação relativa (ARB), outro método importante empregado para cálculo de decisão para previsão de ligação MHC, é uma matriz de afinidades de ligação com base na contribuição independente de cada resíduo ao longo da molécula de peptídeo para a afinidade de ligação. Quando um resíduo  $R$  ocorre na posição  $i$  no peptídeo, é assumido que este contribui com uma constante quantidade  $R_i$  para a energia livre de ligação do peptídeo. O efeito de cada um dos 20 possíveis aminoácidos para cada posição disponível ao longo da sequência peptídica, portanto, pode ser estimada através uma matriz de coeficientes. A propensão global de ligação de cada sequência peptídica, um algoritmo que gera um *ranking* ou "Score", é calculada multiplicando os coeficientes de  $R_i$ . Previu valores de IC50, que fornecem os valores quantitativos  $KD$  (IC50). As previsões são então calculadas pelas transformações matemáticas dadas pelas pontuações do algoritmo (275).

O método de matriz estabilizada (SMM) descrito por (276) podem ser utilizado para calcular as matrizes de afinidade a partir dos dados quantitativos de ligação dos peptídeos à moléculas de MHC. A vantagem deste método é que ele suprime o ruído presente nos dados de treino, causados pelo erro experimental inevitável, bem como o número limitado de pontos de dados.

## 2 Justificativa

Esse projeto visou estudar o mapeamento de epítomos da proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco, importante modelo em virologia, imunologia e bioquímica, em sua forma nativa e após tratamentos em alta pressão hidrostática. De acordo com a revisão introdutória deste trabalho, o TMV é responsável por muitos avanços nestes campos da ciência além da fundação da disciplina de Virologia, mas em termos de mapeamento de epítomos havia uma lacuna a ser explorada. A grande quantidade de informações geradas neste campo para a TMVcp utilizou, na grande maioria dos casos, diferentes modelos experimentais para identificação de epítomos na superfície desta proteína. Neste trabalho, em consonância com a cobertura que a técnica de spot synthesis provê, realizamos este mapeamento para a proteína em questão utilizando anticorpos policlonais derivados da imunização com as formas nativa e com as formas tratadas em alta pressão além de restringir a experimentação a um modelo animal bem definido na literatura, camundongos Balb/C. Para ampliar as informações geradas por estes experimentos, algoritmos de previsão de características bioquímicas e imunológicas de processamento antigênico foram utilizados como ferramentas de suporte e de comparação para os resultados obtidos. Almejou-se integrar estas informações criando um fluxograma experimental *in silício* e *in vitro* para este tipo de análise, enriquecendo os resultados experimentais com o corpo de dados virtuais e permitindo melhores interpretações dos resultados.

### **3 Objetivos**

- Mapeamento de epítomos da forma nativa do TMV

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Mapeamento de epítomos das formas sob tratamento de alta pressão, temperatura e uréia
- Quantificação *in vitro* dos spots reativos
- Comparação com mecanismos de previsão de epítomos para formas nativas e tratadas experimentalmente

## 4 Método

### 4.1 Vírus do mosaico do tabaco.

#### 4.1.1 Seqüenciamento do TMV - Extração de RNA viral

A um volume de 300 µl da suspensão viral foram acrescentados 900 µl de Trizol e incubado a temperatura ambiente (TA) por 5 min. Acrescentou-se 240 µl de Clorofórmio, agitou-se vigorosamente em Vortex por 15 seg e incubou-se a TA por 2 min. Após centrifugação a 12000 rpm por 15 min a 4 °C, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo e acrescentou-se 700 µl de álcool isopropílico (Merck). Após centrifugação a 12300 rpm por 5 min a TA descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 900 µl de etanol 75%. Após agitação vigorosa em Vortex e centrifugação a 9700 rpm por 5 min a TA descartou-se o sobrenadante e após a secagem o precipitado foi ressuspenso em 30 µl de H<sub>2</sub>O DEPC (Dietilpirocarbonato) estéril, incubado a 55 °C por 10 min e congelado a -20 °C para posterior utilização.

#### 4.1.2 Reação de RT-PCR para TMV

Foram utilizados os primers TMVspec e Tobamo1 (Quadro 1) para a reação de RT-PCR.

Primer	Sequência 5'-3'
--------	-----------------

TMVspec	CGGTCAGTGCCGAACAAGAA
Tobamo1	GGTTAGGGGGGGATTTCGAA

Quadro 1: Sequência de nucleotídeos dos primers TMVspec (fwd) e Tobamo1 (rev).

À solução 1 adicionou-se 7 µl de RNA e prosseguiu-se com a desnaturação em Termociclador a 94 °C por 5 min, levando ao banho de gelo imediatamente. Após a desnaturação acrescentou-se ao tubo a solução 2 e prosseguiu-se com a produção de cópias do RNA viral na forma de cDNA e Inativação da Enzima em termociclador, a 37 °C por 50 min seguido de 70 °C por 15 min.

Um gradiente do volume da reação de transcrição foi adicionado a solução de PCR I para um volume final de 50 µl. A reação de PCR seguiu o seguinte protocolo em termociclador: um ciclo de 94°C por 5 min seguido de trinta ciclos mantidos a 94°C por 1 min; 55°C por 1 min e 72°C por 1 min. A reação foi mantida a 72°C por 7 min para passos finais de extensão, após a reação ser completada os produtos foram mantidos a 4°C até visualização.

O sequenciamento, conforme mencionado anteriormente, permitirá a síntese dos peptídeos corretos na membrana de *spot synthesis*.

O sistema de alta pressão hidrostática utilizado consiste de um gerador de pressão conectado à câmara de pressão, descrito em Santos *et al.* (2004). As amostras virais inativadas foram inoculadas via intraperitoneal camundongos

fêmeas da linhagem Balb/C, nos dias 1, 7, 21 e 32, sangrando-se os animais no dia 35.

Os soros dos animais foram titulados através de ensaios de ELISA indiretos, sendo também realizados testes de soroneutralização. Os epítomos de peptídeos lineares identificados foram estudados em maior detalhe.

#### **4.2 Síntese de peptídeos em membrana – Spot synthesis**

A síntese paralela de peptídeos em membrana de celulose (Spot Synthesis) foi desenvolvida visando a obtenção de um grande número de diferentes peptídeos de uma maneira extremamente eficaz. A utilização de automação no processo permite a redução do tamanho dos *spots*, aumentando consideravelmente o número dos mesmos por unidade de área.

Em relação às membranas, estas podem ser amino-PEGuiladas e resistente a tratamento com ácido forte, que tem que ser feito após a adição do último aminoácido. Anteriormente à incorporação do primeiro aminoácido pode-se utilizar um espaçador correspondente à Fmoc-beta-alanina, propositalmente aminoácido não natural, evitando interferências com blocos que são normalmente presentes na proteína. Como a alta densidade de peptídeos prejudica o alongamento da cadeia a ser sintetizado, o que é mais crítico para certas seqüências “difíceis”, e também para cadeias mais longas, utiliza-se uma mistura de Fmoc-beta-alanina e N-acetil alanina (por exemplo, na proporção 1 para 9), que é bloqueada na porção aminoterminal. Caso seja necessária a posterior

solubilização do peptídeo, pode ser utilizado um *link* clivável no lugar da Fmoc-beta-alanina.

A cada ciclo de adição de aminoácido no aminogrupos livre, faz-se um bloqueio de eventuais aminogrupos que não reagiram com o aminoácido no ciclo subsequente através de processo de acetilação (capping). Isso evita incorporação de aminoácido nesse aminogrupos, o que acarretaria uma seqüência incorreta. Assim, só ocorrem seqüências truncadas (terminadas precocemente), e não seqüências incorretas.

Peptídeos sobrepostos cobrindo toda a seqüência da TMVcp foram montados sobre uma membrana de celulose (Abimed - Langenfeld, Alemanha). Seguiu-se o modelo descrito na introdução para a sobreposição dos aminoácidos sintetizados. A membrana de celulose foi preparada de acordo com o protocolo descrito por Laune et al. 2002. Os aminoácidos (Novabiochem) foram depositados em volume mínimo (0,6 ul) com auxílio de um micropipetador automático (Abimed Spot Synthesis-ASP222, Langenfeld, Alemanha), permitindo obter aproximadamente 100 nanomoles de peptídeo por ponto. Inicialmente, a membrana de celulose foi transformada em um suporte que contenha grupamentos amino, para que os aminoácidos possam se ligar.

Isso é obtido pela esterificação de uma F-moc- $\beta$ Ala-OH às funções hidroxila disponíveis na celulose. Além de tornar o suporte funcional, a adição de um grupamento entre o suporte e o peptídeo a ser sintetizado tem como objetivo afastar o peptídeo do suporte para conferir melhor estabilidade na ligação do



peptídeo à membrana. A síntese do peptídeo iniciou-se sempre pelo C-terminal do último aminoácido da seqüência estabelecida. Após desproteção do grupo ligado ao Fmoc pela adição de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF), as funções aminas foram recuperadas e puderam então reagir com o aminoácido a ser acoplado. A eficiência deste passo pode ser monitorada pela reação com o azul de bromofenol, que apresenta coloração azul quando em contato com grupamentos amino livres.

Os aminoácidos foram em seguida ativados por DIPC/HOBT (diisopropilcarbodiimida / hidroxibenzotriazol) e depositados, sendo que estes ativadores propiciam um rendimento de ligação variando de 74-87% por ciclo. Para cada aminoácido foram realizados dois ciclos de acoplamento. As reações de ligação foram monitoradas por mudança de coloração dos spots, passando da cor azul ao verde-amarelado devido à reação de azul de bromofenol, denotando a ausência de aminas livres e, portanto, confirmando o acoplamento. As funções NH<sub>2</sub> livres ou que não reagiram foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF a fim de evitar reações colaterais com os aminoácidos posteriormente adicionados, gerando seqüências erradas, ou outras ligações indesejáveis. O grupo protetor Fmoc do próximo aminoácido foi novamente eliminado em meio básico pela piperidina e a ligação foi verificada pela coloração com azul de bromofenol. Efetuaram-se lavagens da membrana com metanol e após secagem esta membrana foi posicionada no sintetizador para outro ciclo. O acompanhamento se fez necessário durante todo o processo para verificar se a síntese prosseguiu corretamente. Os procedimentos para o acoplamento de cada

aminoácido são realizados em média em 1 h e 15 min. Pelo método de SPOT, o tamanho do peptídeo sintetizado é limitado pelo rendimento, que é ótimo até a faixa de 15-20 aminoácidos. Ao final da síntese, os grupos laterais dos aminoácidos foram desprotegidos pelo tratamento da membrana com ácido trifluoracético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano. Como resultado, é obtida uma membrana de celulose contendo os peptídeos desejados covalentemente ligados à ela em regiões pré-determinadas.

A síntese dos peptídeos iniciou-se sempre pelo C-terminal do último aminoácido das seqüências estabelecidas para cada ponto. Após a retirada do grupo FMOC que se encontrava acoplado à função amina do aminoácido pela adição de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF), esta se tornou disponível para reação com o próximo aminoácido a ser acoplado. A eficiência deste passo pode ser monitorada pela reação com o azul de bromofenol, que apresenta coloração azul quando em contato com grupamentos amina livres.

Os aminoácidos a serem acoplados foram ativados por DIPC/HOBT (diisopropilcarbodiimida/hidroxibenzotriazol) e depositados sobre a membrana. Para cada aminoácido foram realizados dois ciclos de acoplamento. As funções NH<sub>2</sub> que permaneceram livres após o acoplamento foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF, a fim de se evitar reações colaterais com os aminoácidos posteriormente adicionados.

O grupo protetor FMOC do aminoácido recém-acoplado foi novamente eliminado em meio básico pela piperidina a 20%. A membrana foi lavada com

metanol e, após secagem desta, foi reposicionada no sintetizador para outro ciclo. Os ciclos se sucederam desta forma até completar a sequência do peptídeo desejado.

Ao final da síntese, os grupos laterais protetores dos aminoácidos foram retirados pelo tratamento da membrana com ácido trifluoracético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano.

#### 4.2.1 Ensaio imunoenzimático

As membranas contendo os peptídeos sintéticos foram lavadas três vezes com tampão TBS pH 7.4 e então saturadas em solução contendo 1 ml de tampão de bloqueio (*coating buffer*, Sigma) e 0,5 g de sacarose, em 20 ml de tampão TBS-Tween 0,1%, *overnight*. Em seguida, a membrana foi lavada com o tampão TBS-Tween 0,1% e incubada com o 15 µg do anticorpo monoclonal a ser testado, diluído na mesma solução bloqueio, durante 1h e 30 min sob agitação constante. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBS-Tween 0,01% por 10 min. A partir deste momento, dois processos foram utilizados: a revelação com anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina ou com anticorpo secundário ligado a peroxidase.

#### 4.2.2 Revelação Fosfatase Alcalina

O anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina, diluído no tampão de bloqueio, foi incubado com a membrana por 1h. Após nova lavagem sob agitação de 10 minutos com TBS-Tween 0,1% e mais duas lavagens de também 10

minutos cada, com CBS pH 7 sob agitação, foi adicionado o substrato contendo MTT, BCIP e MgCl<sub>2</sub> (Sigma). Vinte minutos depois, a reação foi parada com água destilada e os spots reativos foram detectados pelo método de colorimetria direta. Para isto, a membrana foi fotografada e a intensidade da coloração dos spots foram quantificadas pelo software Totallab Quant.

#### 4.2.3 **Regeneração da membrana**

Para reutilizações posteriores, as membranas foram submetidas a um tratamento de regeneração. Primeiramente efetuou-se 3 lavagens de 10 minutos cada com dimetilformamida (DMF), em seguida, mais 3 lavagens de 10 minutos cada com reagente A (uréia 8M + 1% de SDS + 0.1% de 2-mercaptoetanol) e finalmente outras 3 lavagens de 10 minutos cada com reagente B (etanol / água / ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol).

Como controle, realizou o teste do conjugado, ou seja, após o bloqueio incubou-se a membrana com o conjugado. Realizou-se ainda a incubação da membrana com o soro de camundongos imunizados com Parvovirus Suíno. Realizando em seguida nos dois casos a revelação de acordo com o protocolo descrito acima.

Para o mapeamento de epítomos do vírus do mosaico do tabaco (TMV), foram obtidos soros de camundongos imunizados, feitos testes ELISA desses soros, e a proteína capsídica está sendo seqüenciada utilizando-se o RNA viral. Isso possibilitará a síntese dos peptídeos correspondentes exatamente à seqüência dessa linhagem de TMV.

#### 4.2.4 **Obtenção dos soros com anticorpos.**

Camundongos da linhagem Balb-C foram inoculados em 5 grupos de camundongos de 5 animais cada grupo, sendo que os soros obtidos correspondem ao pool dos 5 animais de cada condição experimental que foi submetido o TMV (nativo, 1 hora, -18, 1M e 4M):

- TMV nativo

-TMV incubado à pressão de 250 MPa por 1 hora, T= 25 °C.

-TMV incubado à pressão de 250 MPa por 1 hora, T= -18 °C.

-TMV incubado à pressão de 250 MPa por 1 hora, T= 25 °C, com 1M de uréia.

-TMV incubado a pressão de 250 MPa por 1 hora, (T= 25 °C) com 4M de uréia.

#### 4.2.5 **Testes ELISA dos soros obtidos**

##### **4.2.5.1 *Obtenção de soros anti-TMV***

Camundongos da linhagem Balb-C foram inoculados com TMV inativados por alta pressão para obtenção de soros anti-TMV. Para cada amostra e tratamento de inativação foram utilizados cinco camundongos fêmeas, imunizados pela via intraperitoneal. Um primeiro grupo foi inoculado com suspensão viral pressurizada a 250 MPa, temperatura controlada de 20 °C e tempo de incubação de 1 h. Um segundo grupo foi inoculado com TMV pressurizado a 250 MPa, temperatura de -

18 °C e tempo de incubação de 1 h. O terceiro grupo foi inoculado com TMV pressurizado a 250 Mpa em combinação com uréia 1 M e temperatura de 20 °C com tempo de incubação de 1 h. O quarto grupo foi inoculado com TMV com uréia 4 M e temperatura de 20 °C. Os esquemas de imunização estão demonstrados no quadro 2.

Quadro 2: Esquema de imunização de camundongos com suspensões virais de TMV. Foram inoculados 5 animais por grupo, após 8 horas de pressão.

<b>Doses</b>	<b>Dias</b>	<b>Antígeno</b>
1º dose	0	15 µg + ACF*
2º dose	15º	10 µg + AIF**
3º dose	28º	10 µg + AIF
Booster	35º	15 µg + AIF
Sangria Branca	38º -39º	

\* Adjuvante Completo de Freund

\*\* Adjuvante Incompleto de Freund

#### **4.2.5.2 Teste de ELISA anti-TMV nos soros de camundongos**

O *pool* dos soros de cada grupo de animais inoculados foi titulado por ensaios de ELISA indireto para a determinação dos títulos de anticorpos anti-TMV, quer para amostras homólogas, quer para amostras heterólogas, aqui denominadas de reatividade cruzada. Placas de poliestireno de 96 orifícios (MaxiSorp - Nunc™) foram sensibilizadas com uma solução de 2 µg/mL de antígeno viral, ressuspenso em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6, em volume de 100 µL/poço, incubadas *overnight*, a 4 °C. Entre as diferentes etapas do ensaio, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS em Tween 20, 0,05%). Após essa primeira etapa as placas foram bloqueadas com 2% de leite em pó desnatado (Molico®), dissolvido em PBS (PBS-Molico) sendo re-incubadas por 60 min a 37 °C. Em seguida, os soros controle (obtidos de animais não imunizados) e imunes diluídos em tampão fosfato foram adicionados às placas, incubando-se a 37 °C durante 120 min. Foram adicionados em cada poço 100 µL do anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com “horseradish peroxidase” (HRPO) na diluição adequada, re-incubando-se a reação a 37 °C por 60 min. Após lavagens, foi adicionado o substrato-cromógeno (0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg % de Ortho-Phenylenediamine (OPD) em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,0). As placas foram incubadas por 30 a 60 min a 25 °C, protegidas da luz, interrompendo-se a

reação pela adição de 50µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N em cada poço da placa, sendo feita imediatamente a leitura das placas em Leitor de ELISA, a 492 nm.

#### **4.2.5.3 Teste de ELISA anti-TMV Reatividade Cruzada:**

##### **Esquema**

Quadro 3: Esquema de Teste de ELISA para a reatividade cruzada. O *pool* de soro foi titulado para amostras heterólogas de antígeno viral.

Soro Anti TMV		Antígeno Viral
A	X	A, B, C, D e E
B	X	B, A, C, D e E
C	X	C, A, B, D e E
D	X	D, A, B, C e E
E	X	E, A, B, C e D



### **4.3 Equipamento de alta pressão**

O sistema utilizado consiste de um gerador de pressão “HIP” que é conectado à câmara de pressão hidrostática, modelo “ISS HP”. No interior da câmara colocou-se uma cubeta cilíndrica de quartzo com volume de aproximadamente 1,2 mL contendo a suspensão de TMV a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão (etanol), a cubeta foi selada com um tubo de polietileno cuja extremidade foi fechada por aquecimento (Fig. 2C). Esse tubo colapsado permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra dentro da cubeta, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos. A cubeta foi fixada em uma base cilíndrica metálica para evitar o movimento desta no interior da bomba. A amostra permaneceu sob temperatura controlada a 20 °C e -18 °C por meio de um banho-maria ligado à câmara de pressão.

#### **4.3.1 Preparação da suspensão viral para os ensaios com alta pressão e temperatura**

Em câmara de fluxo laminar, 2 mL da suspensão viral foram colocados em cubeta de quartzo estéril. As cubetas foram fechadas com um tubo de polietileno estéril selado com calor em uma das extremidades. Somente uma cubeta pode ser pressurizada por vez, portanto, cada cubeta foi preparada no momento do uso e imediatamente instalada no equipamento de alta pressão para incubação pelo tempo e pressão de estudo. As suspensões virais, previamente tituladas com um

título de  $10^{4,5}$  TCID<sub>50%</sub>/1,0 mL. foram expostas às condições de pressão conforme o quadro 1. Após exposição à alta pressão, as amostras foram trazidas à pressão atmosférica. A mesma suspensão viral não exposta à pressão foi utilizada como controle. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **4.4 Bioinformática**

As análises de similaridade das proteínas a serem modeladas foram realizadas utilizando a ferramenta BLAST. O BLAST está disponível na internet e é composto por cinco programas: Protein-BLAST, Nucleotide-BLAST, BLASTx, tBLASTn e o tBLASTp. Estes programas têm como função procurar similaridades de seqüência primárias de proteínas e nucleotídeos. O Protein-BLAST, empregado neste trabalho, utiliza a seqüência protéica fornecida pelo usuário para fazer uma busca em banco de dados de proteínas por similaridade. Ele é composto por três algoritmos, o BLASTP, PSI-BLAST, PHI-BLAST.

O modelo 3D da TMVcp foi obtido através do banco de dados de proteínas (PDB) registrado no código de acesso 3J06. O modelo molecular tridimensional da TMVcp foi adaptado às condições de mapeamento de epítomos através do programa Molegro Virtual Docker evidenciando as sequencias de epítomos reconhecidas experimentalmente na estrutura determinada.

Para identificar candidatos a epítomos nos peptídeos de TMV para a síntese, usamos a sequencia derivada dos experimentos com TMV em algoritmos de computador separados; inicialmente analisamos a sequencia com base nas propriedades físico-químicas dos aminoácidos que a compõem usando algoritmos

de análise da área de superfície acessível ao solvente (277), classificação hidrofóbica e de antigenicidade dos componentes (147), processo de ubiquitinação (278), Rede Neural Artificial (ANN; 9-mer peptídeos apenas) (274), Afinidade média relativa (ARB) (275), Método de Matrix estabilizada (SMM) (276). Os algoritmos de ANN, ARB, e SMM foram usados com ou sem a influência de previsões imuno-proteossomal clivagem (267).

A sequência determinada experimentalmente foi avaliada através dos sites de análise de área de superfície acessível e também do pacote incluído no conjunto de softwares CLC Workbench 5.5, esta ferramenta permite a interpretação por aminoácido da probabilidade de exposição ao solvente na estrutura da proteína usada. Com o auxílio destes resultados foi possível inferir sobre regiões expostas pelos tratamentos, em conjunção com os algoritmos de predição de hidrofobicidade e antigenicidade que disponíveis online e no software CLC Workbench. Brevemente, para pequenas janelas de peptídeos de sete peptídeos sobrepostas até a cobertura completa da proteína, as características de afinidade para a dada região são calculadas. Estas ferramentas consideram dados sobre polaridade e hidrofobicidade em condições de transferência da proteína da água para álcool (escala de hidrofobicidade Kyte-Doolittle) e da água para vácuo (escala de antigenicidade de Hopp-Woods) para cada oligopeptídeo gerado *in silício*.

Analizamos o potencial de interação com MHC de camundongos para classe I (Kd, Dd e Ld) e MHC classe II (IAd e IEd). Todos os algoritmos foram

acessados via internet no iedb ([www.immuneepitope.org](http://www.immuneepitope.org)) e ExPaSy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). As pontuações para cada um dos algoritmos para todos os peptídeos foram alinhadas para comparar a ANN, ARB, SMM (com e sem influência predição proteossomal). Nós desenvolvemos uma comparação entre os métodos de previsão com os resultados de mapeamento pareando os resultados obtidos pela previsão com as intensidades de sinal obtidas pela quantificação das membranas de spot synthesis dos dados experimentais.

Os mecanismos de mapeamento de epítomos de células B também foram empregados. Algoritmos que lançam mão da estrutura cristalografada da proteína do capsídeo do TMV empregaram o arquivo do banco de dados de proteínas (PDB) 3J06 que reconstruiu a estrutura helicoidal deste vírus. Desta forma, combinando resultados de área de superfície acessível com reconhecimento e exposição de aminoácidos na estrutura da proteína e classificando-a de acordo com potenciais de afinidade para cada fragmento. Além disso algoritmos de previsão para epítomos contínuos (lineares) ou descontínuos (conformacionais) também foi realizada. Utilizou-se, portanto, os seguintes algoritmos: IEDB (229), BepiPred (279), SEPPA (280).

## 5 Resultados

### 5.1 Experimentos *in silicio*

#### 5.1.1 Área de superfície acessível da TMVcp

Usando os algoritmos de busca descritos obtivemos os seguintes resultados de previsão de características bioquímicas para a sequência gerada através do sequenciamento da proteína do capsídeo do vírus do mosaico do tabaco. De acordo com o mecanismo utilizado *scores* são gerados para cada aminoácido da sequência, valores representados em verde e são definidos como expostos na superfície da proteína. Estes resultados estão representados na figura abaixo (figura 17).

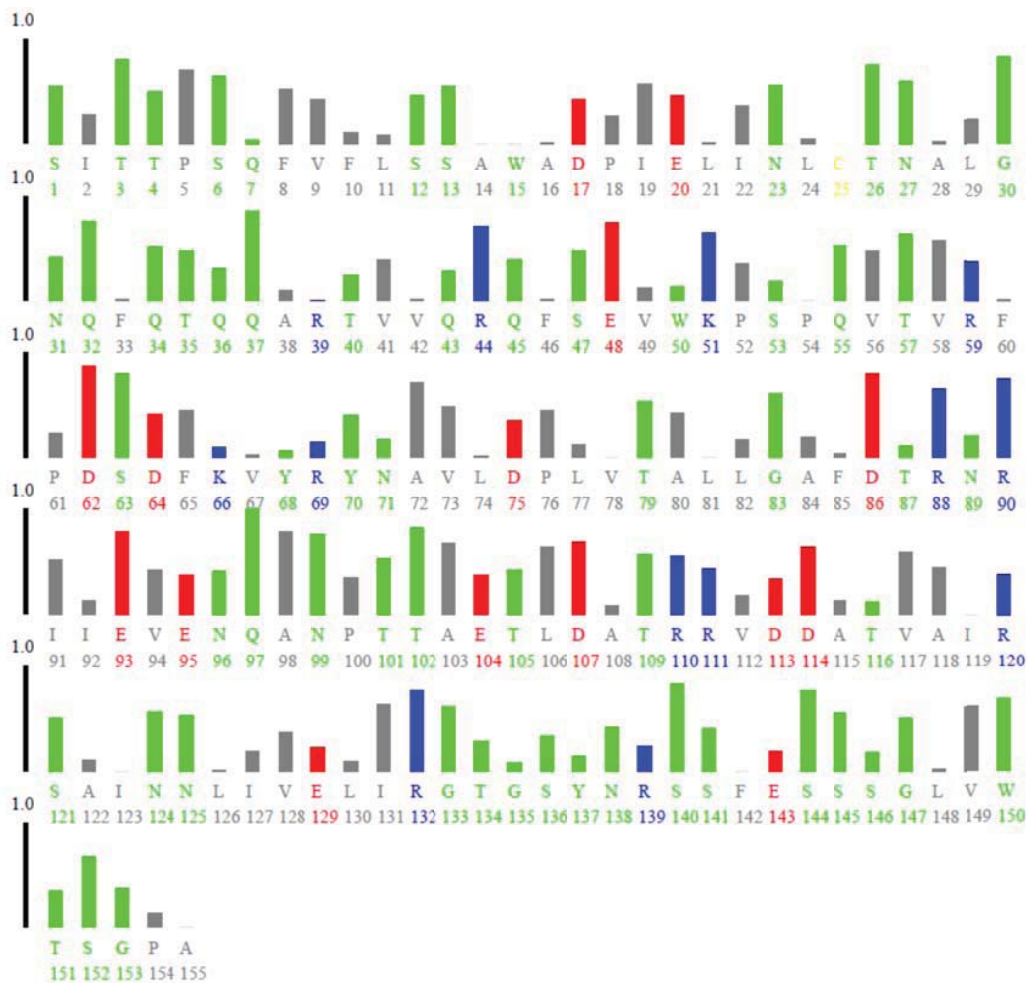


Figura 17: Área de superfície acessível para a TMVcp. Sequencia completa da proteína individualizada por aminoácidos com os respectivos scores de exposição (barras) e características (verde – aminoácidos polares; vermelho – aminoácidos ácidos; azul – aminoácidos básicos; cinza – aminoácidos hidrofóbicos).

As regiões seguintes são expostas segundo o algoritmo usado: resíduos 1 a 6, 12 e 13, 26 e 27, 30 a 32, 34 a 37, 47, 55, 57, 63, 70 e 71, 79, 83, 96 a 99, 101 e 102, 121, 124 e 125, 133 a 138, 144 a 147, e 150 a 153. Os demais aminoácidos são representados nas figuras 17 a 22, que também trazem os resultados individuais dos cálculos para cada resíduo da sequencia usada, informando, na

ultima coluna, o veredicto do algoritmo sobre a exposição do aminoácido (o – out / i – inside) além de probabilidades de interação com as regiões expostas.

Residue		Total	Apolar	Backbone	Sidechain	Ratio(%)	In/C
SER	3	60.65	38.39	5.41	55.24	71.4	o
ILE	4	53.83	31.28	22.56	31.28	21.2	
THR	5	114.55	78.30	23.64	90.91	85.6	o
THR	6	66.22	41.18	3.72	62.50	58.9	o
PRO	7	110.68	100.52	11.10	99.58	94.7	o
SER	8	69.89	43.84	12.23	57.67	74.5	o
GLN	9	7.26	0.00	0.00	7.26	5.1	i
PHE	10	109.27	107.86	2.32	106.95	59.4	o
VAL	11	68.51	68.05	6.69	61.82	50.6	o
PHE	12	22.57	22.57	0.00	22.57	12.5	i
LEU	13	14.91	8.95	5.97	8.95	6.1	i
SER	14	60.91	58.85	16.35	44.56	57.6	o
SER	15	54.52	24.86	10.17	44.35	57.3	o
ALA	16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
TRP	17	0.08	0.00	0.08	0.00	0.0	i
ALA	18	2.43	2.23	2.43	0.00	0.0	i
ASP	19	49.21	7.60	0.00	49.21	43.6	
PRO	20	36.64	35.57	1.70	34.94	33.2	
ILE	21	117.48	117.48	4.10	113.38	77.0	o
GLU	22	74.03	32.76	1.14	72.89	51.6	o
LEU	23	1.15	1.15	0.00	1.15	0.8	i
ILE	24	67.50	67.48	0.02	67.48	45.8	
ASN	25	72.43	4.80	3.90	68.53	60.0	o
LEU	26	15.61	15.61	0.00	15.61	10.7	i
CYS	27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
THR	28	103.60	78.71	17.66	85.94	80.9	o
ASN	29	91.47	51.84	23.43	68.04	59.5	o
ALA	30	6.17	6.17	3.08	3.09	4.8	i
LEU	31	45.81	45.79	0.02	45.79	31.3	
GLY	32	70.60	51.95	70.60	0.00	81.0	o
ASN	33	50.27	8.41	13.27	37.00	32.4	
GLN	34	126.75	49.12	7.49	119.25	83.0	o
PHE	35	2.08	0.27	1.82	0.27	0.1	i
GLN	36	75.84	42.07	5.14	70.70	49.2	
THR	37	78.24	76.94	10.81	67.43	63.5	o
GLN	38	77.00	67.80	13.20	63.80	44.4	
GLN	39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
ALA	40	19.86	15.84	5.34	14.51	22.4	
ARG	41	2.72	1.33	0.00	2.72	1.4	i
THR	42	45.66	26.10	1.34	44.31	41.7	
VAL	43	84.18	82.50	5.54	78.64	64.3	o
VAL	44	3.21	3.21	0.00	3.21	2.6	i
GLN	45	52.68	0.83	0.00	52.68	36.7	
ARG	46	155.81	72.36	5.78	150.03	76.7	o
GLN	47	61.42	23.08	0.52	60.90	42.4	
PHE	48	1.03	0.34	0.69	0.34	0.2	i
SER	49	54.80	19.83	20.63	34.18	44.2	
GLU	50	112.03	36.90	6.36	105.68	74.8	o
VAL	51	16.97	16.70	3.13	13.84	11.3	i
TRP	52	27.10	16.06	11.05	16.06	7.1	i
LYS	53	127.83	83.43	1.71	126.12	76.7	o
PRO	54	58.77	45.27	13.50	45.27	43.0	
SER	55	20.20	14.26	13.15	7.05	9.1	i
PRO	56	0.06	0.06	0.00	0.06	0.1	i
GLN	57	77.78	17.46	0.24	77.54	54.0	o
VAL	58	77.23	76.42	0.81	76.42	62.5	o
THR	59	86.27	60.20	2.18	84.09	79.2	o
VAL	60	97.90	97.90	7.94	89.96	73.6	o
ARG	61	78.54	20.17	4.71	73.83	37.8	

Figura 18 Resultados do algoritmo de previsão para área de superfície acessível. Disposição dos aminoácidos da sequência da TMVcp (1 a 61) em termos de exposição, polaridade e previsão de exposição.



PHE	62	1.43	0.09	1.39	0.04	0.0	i
PRO	63	41.76	41.75	12.01	29.75	28.3	
ASP	64	115.15	23.67	23.33	91.82	81.3	o
SER	65	90.08	49.95	16.63	73.45	94.9	o
ASP	66	55.23	41.21	11.26	43.96	38.9	
PHE	67	91.00	90.95	0.05	90.95	50.5	o
LYS	68	22.23	5.78	0.00	22.23	13.5	i
VAL	69	4.22	4.22	0.00	4.22	3.4	i
TYR	70	10.30	7.91	0.00	10.30	5.3	i
ARG	71	28.34	3.80	0.00	28.34	14.5	i
TYR	72	83.84	45.92	11.34	72.50	37.5	
ASN	73	24.32	3.68	3.68	20.64	18.1	i
ALA	74	83.00	73.59	24.85	58.15	89.6	o
VAL	75	82.06	77.10	17.50	64.57	52.8	o
LEU	76	0.36	0.36	0.00	0.36	0.2	i
ASP	77	38.31	5.17	0.00	38.31	33.9	
PRO	78	71.68	66.20	5.52	66.16	62.9	o
LEU	79	28.06	28.06	1.24	26.82	18.3	i
VAL	80	0.09	0.09	0.00	0.09	0.1	i
THR	81	68.93	33.79	6.18	62.75	59.1	o
ALA	82	50.33	45.76	18.60	31.73	48.9	
LEU	83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
LEU	84	36.97	35.79	1.23	35.73	24.4	
GLY	85	51.48	25.65	51.48	0.00	59.0	o
ALA	86	10.80	10.54	3.38	7.42	11.4	i
PHE	87	9.46	0.18	9.28	0.18	0.1	i
ASP	88	106.43	38.25	22.01	84.42	74.7	o
THR	89	4.20	3.76	3.92	0.27	0.3	i
ARG	90	145.32	71.40	13.25	132.07	67.6	o
ASN	91	15.53	5.27	8.98	6.56	5.7	i
ARG	92	160.80	85.12	7.92	152.88	78.2	o
ILE	93	99.09	98.83	0.26	98.83	67.1	o
ILE	94	29.90	29.48	0.42	29.48	20.0	
GLU	95	126.56	47.39	25.45	101.11	71.6	o
VAL	96	72.25	61.59	19.59	52.66	43.1	
GLU	97	66.43	53.33	10.01	56.42	40.0	
ASN	98	56.40	4.05	9.03	47.37	41.4	
GLN	99	167.64	66.88	24.06	143.59	99.9	o
ALA	100	91.49	67.02	37.08	54.41	83.8	o
ASN	101	101.09	30.55	13.98	87.11	76.2	o
PRO	102	59.88	56.61	3.50	56.39	53.6	o
THR	103	74.60	50.70	17.27	57.33	54.0	o
THR	104	104.32	70.26	10.83	93.50	88.0	o
ALA	105	77.64	73.09	15.11	62.53	96.4	o
GLU	106	60.35	37.33	16.06	44.29	31.4	
THR	107	49.56	29.44	0.00	49.56	46.7	
LEU	108	121.38	113.44	8.02	113.37	77.5	o
ASP	109	82.92	24.16	4.67	78.24	69.2	o
ALA	110	11.27	11.20	0.46	10.81	16.7	i
THR	111	74.63	40.13	14.09	60.54	57.0	o
ARG	112	115.08	47.89	1.56	113.51	58.1	o
ARG	113	81.61	36.08	0.00	81.61	41.7	
VAL	114	34.17	34.17	0.00	34.17	27.9	
ASP	115	26.16	9.03	0.00	26.16	23.1	
ASP	116	24.73	0.11	4.36	20.37	18.0	i
ALA	117	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
THR	118	10.55	3.24	0.15	10.40	9.8	i
VAL	119	19.98	19.98	1.15	18.83	15.4	i
ALA	120	12.08	8.43	5.78	6.30	9.7	i
ILE	121	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
ARG	122	83.60	54.37	0.10	83.50	42.7	

Figura 19: Resultados do algoritmo de previsão para área de superfície acessível. Disposição dos aminoácidos da sequência da TMVcp (62 a 122) em termos de exposição, polaridade e previsão de exposição.

SER	123	14.94	12.08	6.74	8.20	10.6	i
ALA	124	11.10	11.10	0.81	10.29	15.9	i
ILE	125	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
ASN	126	72.48	10.56	0.00	72.48	63.4	o
ASN	127	65.73	9.77	7.11	58.63	51.3	o
LEU	128	0.28	0.28	0.00	0.28	0.2	i
ILE	129	36.39	36.26	0.13	36.26	24.6	
VAL	130	68.13	67.51	0.62	67.51	55.2	o
GLU	131	30.55	0.06	0.06	30.49	21.6	
LEU	132	11.70	1.82	10.80	0.90	0.6	i
ILE	133	119.98	102.87	24.27	95.71	65.0	o
ARG	134	164.80	78.90	28.31	136.49	69.8	o
GLY	135	51.63	26.75	51.63	0.00	59.2	o
THR	136	38.09	26.12	6.37	31.73	29.9	
GLY	137	5.93	2.62	5.93	0.00	6.8	i
SER	138	35.82	17.57	10.33	25.49	32.9	
TYR	139	31.13	17.76	4.07	27.06	14.0	i
ASN	140	53.73	16.42	0.23	53.49	46.8	
ARG	141	47.48	10.80	0.94	46.54	23.8	
SER	142	91.56	48.62	17.48	74.08	95.7	o
SER	143	45.41	30.06	6.62	38.79	50.1	o
PHE	144	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
GLU	145	29.37	8.34	18.35	11.02	7.8	i
SER	146	82.32	27.85	30.22	52.09	67.3	o
SER	147	68.84	45.14	37.55	31.29	40.4	
SER	148	24.12	9.56	24.07	0.06	0.1	i
GLY	149	43.33	32.67	43.33	0.00	49.7	
LEU	150	1.48	0.03	1.48	0.00	0.0	i
VAL	151	103.76	93.75	14.31	89.45	73.1	o
TRP	152	166.46	148.29	11.48	154.98	69.0	o
THR	153	48.56	42.81	0.61	47.95	45.2	
SER	154	71.02	34.35	11.84	59.18	76.5	o
GLY	155	29.00	29.00	29.00	0.00	33.3	
PRO	156	22.47	22.47	0.00	22.47	21.4	
ALA	157	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	i
A	4	233.33	54.79	99.45	133.87		
U	5	195.24	77.24	53.41	141.83		
G	6	188.76	56.54	88.36	100.40		
-----							
POLAR	area/energy		=		3579.02		
APOLAR	area/energy		=		5433.24		
UNKNOW	area/energy		=		0.00		
-----							
Total	area/energy		=		9012.26		
-----							
Number of surface atoms			=		728		
Number of buried atoms			=		505		
Number of atoms with ASP=0			=		51		

Figura 20: Resultados do algoritmo de previsão para área de superfície acessível. Disposição dos aminoácidos da sequência da TMVcp (123 a 157) em termos de exposição, polaridade e previsão de exposição.

Estes resultados são reavaliados na figura 21 através de um terceiro algoritmo que inclui como resultados as probabilidades de interação para cada

resíduo na sequência da proteína e através da estrutura em cristalografia depositada no *Protein Data Bank* (figura 22), revelando na estrutura tridimensional os prováveis sítios expostos, bem como as possibilidades de interação, marcadas em gradação vermelha.

```

> 3 62
SITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFOTQQARTVVORQFSEVWKPSPQVTVRF
86 84 75 90 97 90 0 95 89 31 52 80 57 0 0 0 22 35 83 51 0 86 93 36 0 93 83 0 40 51 12 23 0 23 22 22 2 13 0 9 14 0 16 15 11 0 1
10 10 10 10 10 10 0 10 10 1 7 10 8 0 0 0 0 0 10 5 0 10 10 1 0 10 10 0 2 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 10 0 0 10 10

> 63 122
FDSDFKVVRYNAVLDPDLVTALLGAFDTRNRRIIEVENQANPTTAETLDATRVDATVAIR
36 57 51 28 39 24 0 35 47 42 30 63 86 0 39 79 59 0 21 59 0 32 20 11 0 38 25 21 22 55 60 34 67 90 24 19 44 55 37 33 47 79 78 22
1 8 5 0 0 0 0 0 4 2 0 10 10 0 0 10 8 0 0 8 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 7 7 1 5 10 0 0 3 5 0 0 4 10 10 0 3 8 0 1 3 0 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0

> 123 157
SAINNLVIVELIRGTGSYKRSSFESSGLVMTSGPA
28 20 0 56 60 0 60 57 54 68 76 84 90 53 26 61 44 23 19 67 50 0 38 82 94 34 63 0 93 67 40 75 85 33 0
0 0 0 6 8 0 10 8 6 10 10 10 10 7 0 8 4 0 0 9 5 0 0 10 10 2 8 0 10 10 1 10 10 0 0

```

Figura 21: Resíduos envolvidos em interações na superfície da proteína TMVcp. Resultados do algoritmo de predição SPPIDER II. Primeira linha: numeração dos resíduos, segunda linha: sequência da TMVcp, terceira linha: probabilidade média para cada resíduo ser um sítio de interação, quarta linha: número de redes neurais com resultado positivo para o sítio de interação.

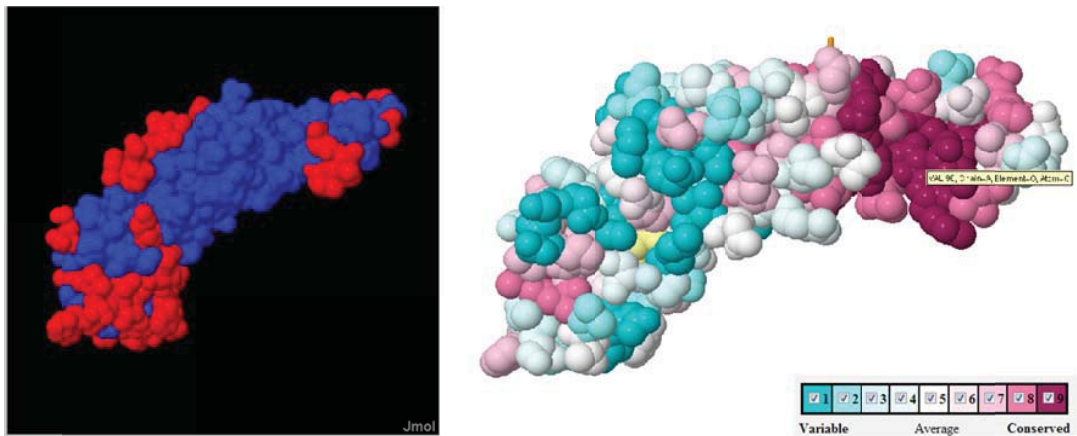


Figura 22: Esquerda: Área de superfície acessível mapeada na estrutura cristalográfica 3J06 do PDB para a TMVcp, resíduos marcados em vermelho mapeiam para pontos de interação. site <http://sppider.cchmc.org/>. Direita: Representação classificativa da conservação na estrutura 3J06 após alinhamento múltiplo e análise por

homologias. As cores representam graus de conservação, azul escuro: maior variação e roxo escuro: maior conservação encontrada pelos alinhamentos gerados pelo site <http://consurf.tau.ac.il>.

### 5.1.2 Ubiquitinação da TMVcp

Seguindo os passos de processamento antigênico na sequência de apresentação via MHC classe I, foram geradas previsões sobre os possíveis sítios de ubiquitinação na TMVcp, também com algoritmos que reconhecem lisinas passíveis de marcação para degradação via proteassomo. Estes resultados são demonstrados abaixo na figura 23. Dois algoritmos não encontraram lisinas com *scores* indicativos de ubiquitinação e o terceiro algoritmo empregado reconheceu, na posição 54, uma lisina com baixa probabilidade de marcação para degradação.

✳ **BDM-PUB: Prediction of Ubiquitination sites with Bayesian Discriminant Method**

[Go back to BDM-PUB prediction page](#)

Predicted Ubiquitination sites:

>

Peptide	Position	Score	Threshold
RQFSEVW <b>K</b> PSPQVT	54	0.52	0.3

Figura 23: Previsão de ubiquitinação pelo método probabilístico bayesiano.

No gráfico a seguir, do segundo algoritmo usado, representa-se as lisinas com os resultados de previsão de ubiquitinação na sequência completa. Neste resultado é possível visualizar as posições 54 e 70 com seus respectivos *scores* de ubiquitinação, abaixo dos limites de decisão.

## CKSAAP\_UBSITE

A PREDICTOR OF PROTEIN UBIQUITINATION SITES

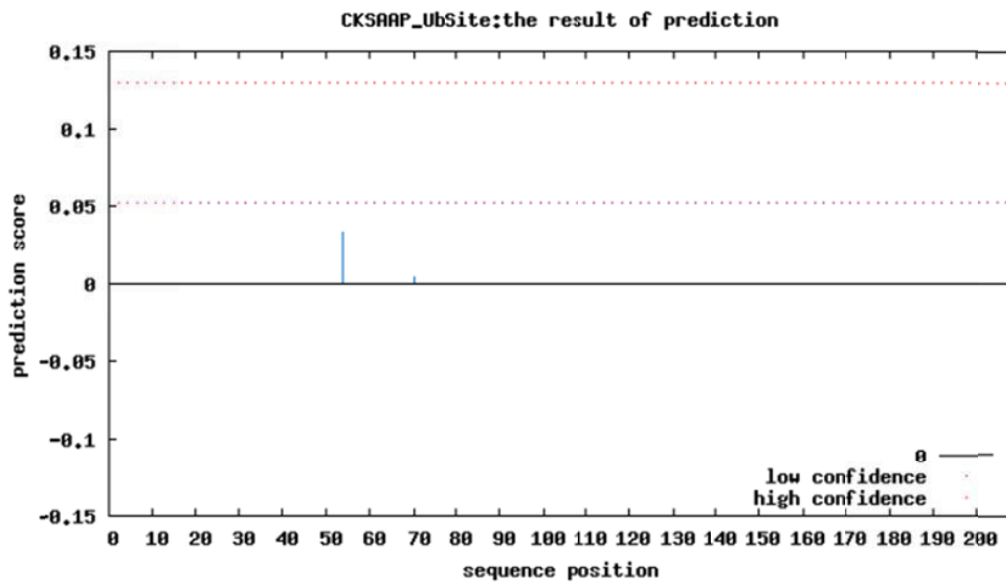


Figura 24: Previsão de ubiquitinação de lisinas pelo algoritmo CKSAAP.

### 5.1.3 Antigenicidade e Hidrofobicidade da TMVcp

As previsões de hidrofobicidade e antigenicidade pelos algoritmos de Kyte-Doolittle e Hopp-Woods explicam, de acordo com a sequência inserida nos modelos, quais regiões interagem melhor com os solventes. A figura 25 representa estes resultados.

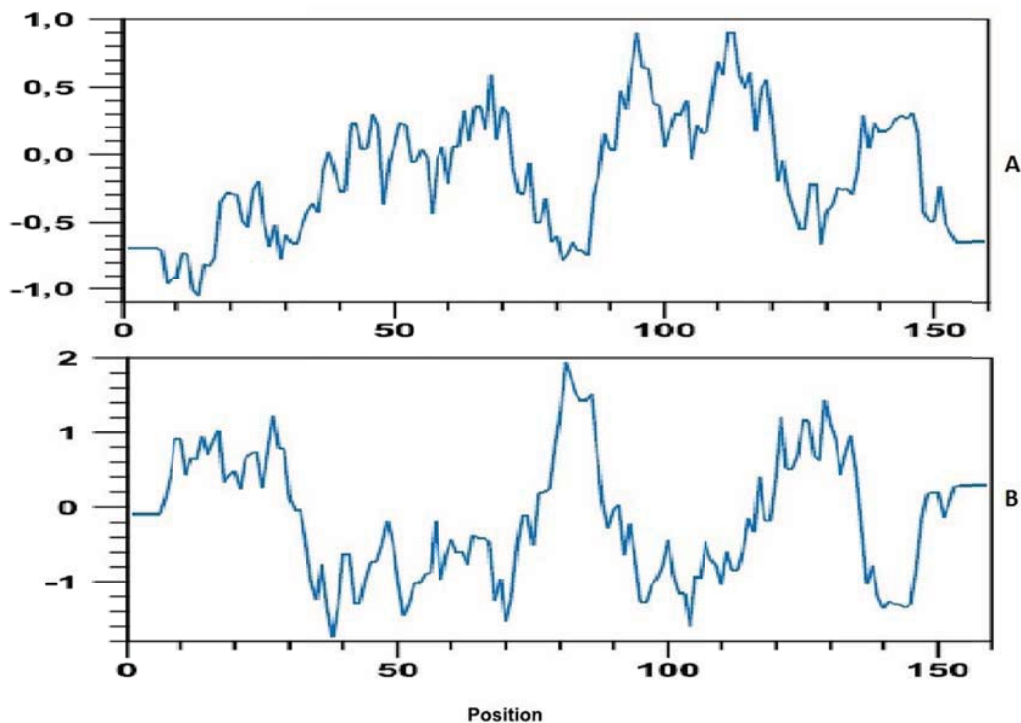


Figura 25: Hidrofobicidade e antigenicidade (Kyte-Doolittle acima e Hopp-Woods abaixo) para a TMVcp.

Segundo o algoritmo de Hopp-Woods, as regiões com maior probabilidade de antigenicidade estão contidas nos intervalos entre os resíduos 20 a 30, 40 a 70, 85 a 125 e 130 a 150. O algoritmo de Kyte-Doolittle retorna que as regiões marcadamente hidrofílicas estão contidas nos intervalos de 30 a 70, 90 a 120 e de 135 a 145. Observam-se também variações internas nestes intervalos.

A figura 26 representa a conjugação das informações geradas por estes algoritmos para as características bioquímicas previstas para a proteína, alinhadas à sequência para melhor visualização dos dados, apresentando dados sobre a estrutura secundária acima da sequência, polaridade dos aminoácidos classificada individualmente em cores, seguida dos algoritmos de previsão para

hidrofobicidade, antigenicidade, probabilidade de exposição na superfície externa da proteína e também flexibilidade da cadeia para estas regiões.

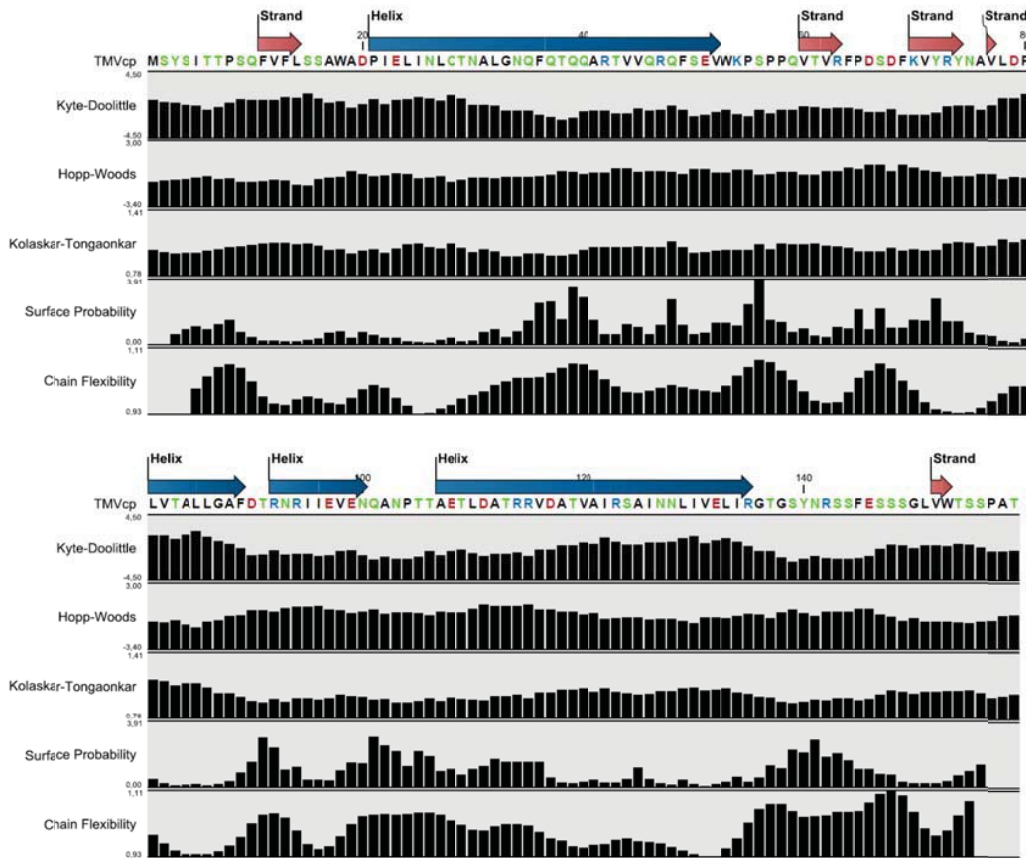


Figura 26: Representação esquemática da TMVcp gerada pelo programa CLC Workbench alinhando os algoritmos de previsão de hidrofobicidade (kyte-doolittle), antigenicidade (Hopp-Woods), hidrofobicidade (Kolaskar-Tongaonkar), probabilidade de exposição na superfície (Surface probability) e flexibilidade de cadeia (Chain flexibility) com a estrutura secundária e polaridade dos aminoácidos.

Observa-se aqui que os primeiros vinte aminoácidos da proteína estão inseridos em uma região que organiza-se em uma folha beta, além de ter baixa probabilidade de exposição e flexibilidade restrita às regiões que antecedem esta estrutura e nas regiões que a sucedem, observa-se também baixa probabilidade de exposição na superfície dos resíduos que estão contidos na região da folha

beta e resíduos subsequentes, em contraste com os resíduos que são sintetizados antes desta conformação secundária.

A região seguinte, contida entre os resíduos 20 a 60, possui uma alfa-hélice com maior hidrofobicidade e antigenicidade; composta por aminoácidos polares em sua grande maioria. É uma região que tem maior probabilidade de exposição na superfície, além de maior flexibilidade da cadeia, por conta da estrutura secundária formada e também das forças de interação internas por ela geradas.

Entre os resíduos 61 a 80, observam-se duas folhas beta (60 – 64, 70 – 75) bem definidas e poucos aminoácidos polares. Nestas condições, esta região apresenta valores menores de hidrofobicidade e antigenicidade se comparadas às regiões anteriores, além de menores probabilidades de exposição na superfície da proteína e restrição em flexibilidade da cadeia.

A região entre os resíduos 81 a 100 possui duas alfa-hélices, a alta hidrofobicidade na região da primeira alfa hélice (81 a 90) que reflete em previsão de baixa antigenicidade para este fragmento bem como baixa probabilidade de exposição e flexibilidade da cadeia pode ser explicada pela composição de aminoácidos deste fragmento, como observado na coloração da sequencia. Isto não é observado no fragmento seguinte (91 a 100) que possui aminoácidos polares em sua composição tem menores índices de hidrofobicidade com consequente aumento em antigenicidade da região bem como maior probabilidade de exposição e flexibilidade para os aminoácidos citados, internos a essa região



também encontra-se aminoácidos apolares que respondem pelas variações em exposição e flexibilidades relatadas para o fragmento na figura 26.

A região compreendida entre os aminoácidos 101 a 135 possui aminoácidos polares nas porções iniciais (101 a 120) que alteram o perfil de hidrofobicidade e antigenicidade do fragmento, juntamente com a conformação em alfa hélice observa-se maior probabilidade de exposição destes aminoácidos iniciais em comparação com a porção final desta região em análise, onde os valores de previsão de exposição e flexibilidade diminuem acentuadamente com consequente aumento em hidrofobicidade e diminuição de antigenicidade.

A última região analisada entre os resíduos 136 a 159 possui menores índices de hidrofobicidade em consonância com resíduos polares nas posições iniciais deste fragmento com altas probabilidades de exposição e flexibilidade, resultados que são alterados na região C-terminal da proteína com a presença de uma folha beta e aumentos de hidrofobicidade e redução em antigenicidade.

## **5.2 Imunoinformática**

### **5.2.1 MHC classe I**

#### **5.2.1.1 *Previsão de clivagem por proteassomo da TMVcp***

Utilizando algoritmos de previsão de clivagem por proteassomo com base em modelos de SMM obteve-se os seguintes resultados para a sequência da TMVcp, representados na figura 27, com dados por aminoácido plotados em termos de intensidade de clivagem por posição na sequência.

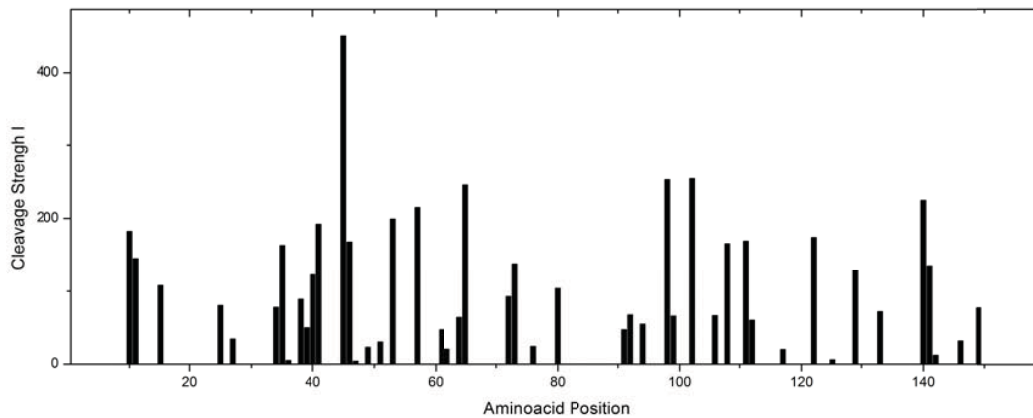


Figura 27: Previsão de clivagens na TMVcp pelo proteassomo segundo o algoritmo PProC.

A susceptibilidade à clivagem por proteassomo da TMVcp foi avaliada usando o algoritmo definido por Nielsen (281) e da ferramenta de previsão para a clivagem, que emprega dois algoritmos diferentes de previsão de clivagens via proteossomo e imunoproteossomo. Várias regiões produziram contagens elevadas com estes métodos, o que indica a presença de locais que eram potencialmente disponíveis para a clivagem. As figuras 27 e 28 mostram as previsões de clivagem por proteossomo via IEDB e PProC (NN e SVM, respectivamente).

Considerando o algoritmo seguinte, que avalia a sequência em termos de oligopeptídeos com tamanhos customizáveis para a análise por redes neurais, empregou-se na predição oligopeptídeos com nove aminoácidos em sobreposição. O gráfico gerado para estes resultados relaciona probabilidades de clivagem no eixo das ordenadas por fragmentos de nove peptídeos por ponto do eixo das abscissas.

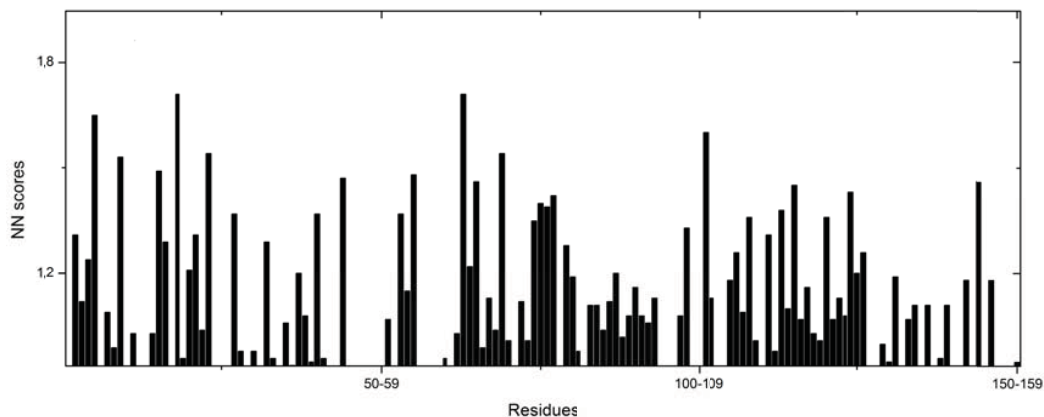


Figura 28: Previsão de clivagens na TMVcp pelo proteassomo segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB.

Com esta condição aplicada à sequência observou-se grande número de clivagens possíveis na TMVcp. Diferentes intensidades de clivagem relacionam-se com dados gerados anteriormente mencionados sobre exposição, acessibilidade ao solvente, graus de hidrofobicidade específicas para as regiões distintas da proteína. Observa-se aqui maior probabilidade de clivagem nas regiões de maior acessibilidade, menor hidrofobicidade e maior flexibilidade da cadeia para reconhecimento e clivagem pelas enzimas proteolíticas virtuais. As regiões com menor *score* de clivagem concordam com regiões de menor exposição e maior hidrofobicidade.

Dados para a previsão destas clivagens, em termos de *scores* são representados na tabela 1 do anexo II. A tabela 1 também apresenta os dados de previsão para condições de clivagem via proteassomo, disponíveis nas ferramentas de predição do site IEDB.

### 5.2.2 Afinidade de ligação ao transportador TAP

A afinidade de ligação TAP foi avaliada com os algoritmos IEDB e da TAP Hunter e TAP Pred. Como mostrado nas figuras 29 a 31, várias regiões foram consideradas adequadas para a ligação em termos de afinidade. As regiões que apresentaram valores elevados, mas não se correlacionaram com os previstos pontos de clivagem proteossomal e com os nossos resultados experimentais não foram consideradas. O método iedb revelou uma paisagem semelhante à da quantificação na membrana e foram identificados dois picos que se correlacionaram com os nossos resultados experimentais. Os resíduos de aminoácidos 20-35, 47-58, 77-84 e 94-104 tiveram as maiores pontuações e foram possivelmente associadas ao transportador TAP; estas regiões também foram identificadas no mapeamento de epítomos. O algoritmo de predição TAP Hunter também identificou quatro grandes regiões da sequência que são comparáveis aos nossos resultados experimentais sobrepujam com os resultados da predição IEDB. As regiões identificadas por estes métodos também devem ter afinidades de ligação elevadas para receptores de MHC de classe I, a fim de ser eficiente exposta nas células normais.

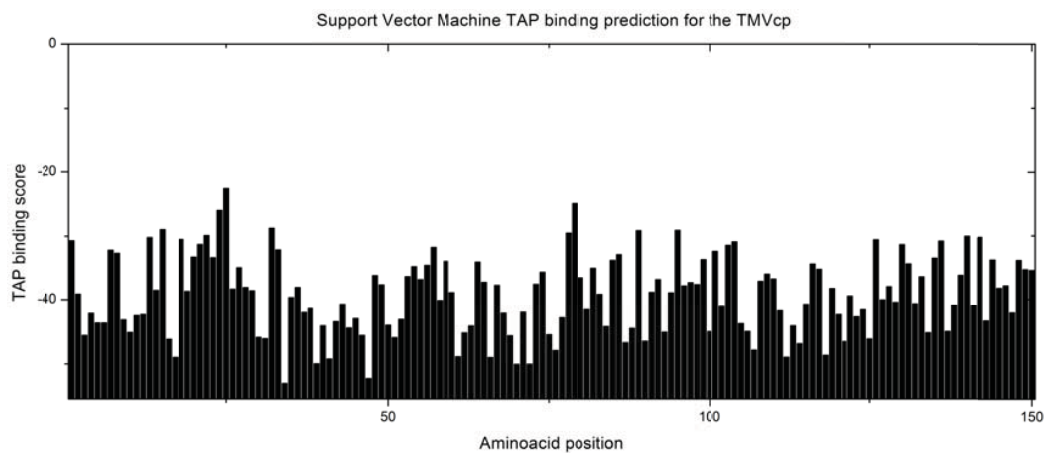


Figura 29: Previsão de afinidades de ligação ao transportador TAP para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB.

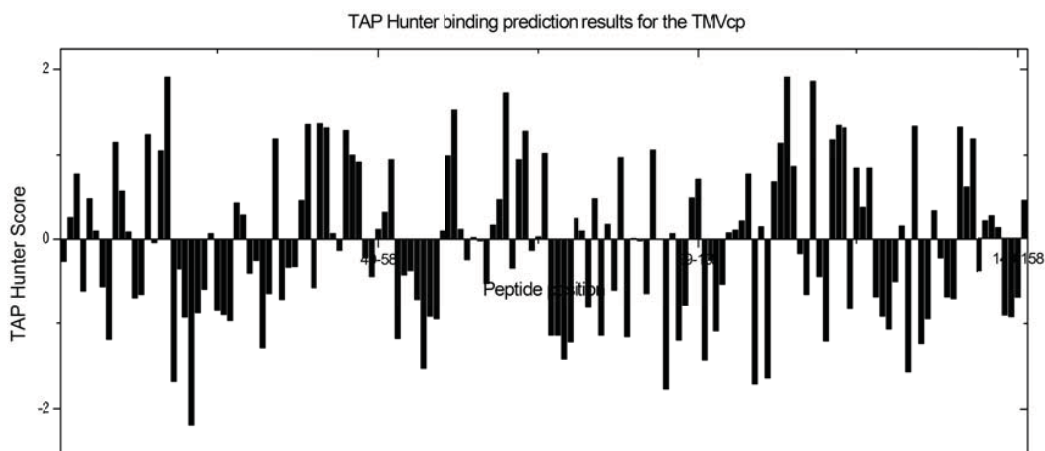


Figura 30: Previsão de afinidades de ligação ao transportador TAP para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo TAP hunter.

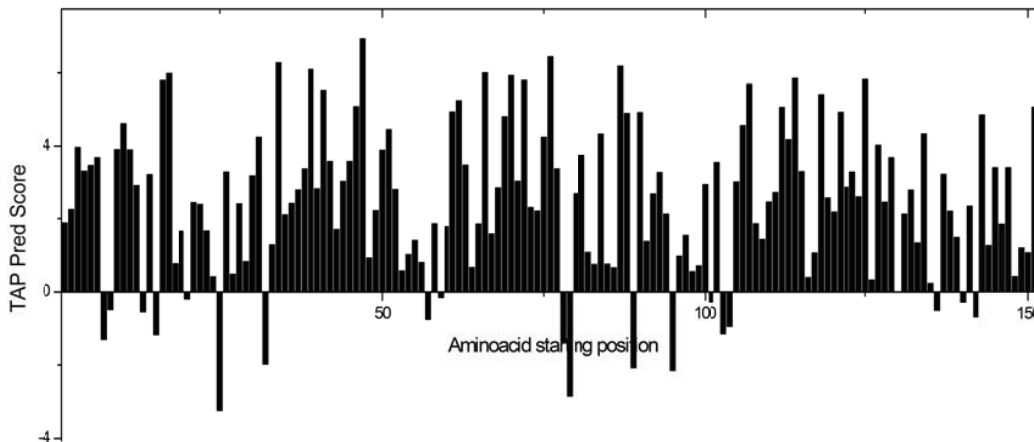


Figura 31: Previsão de afinidades de ligação ao transportador TAP para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo TAP Pred.

### 5.2.3 Previsão de afinidade de ligação para MHC classe I

Através da previsão de afinidades para o MHC expresso pelo alelo H2-Dd obteve-se o gráfico da figura 32 que ilustra os valores de ligação para cada nonamero, que por sua vez são gerados por sobreposição das sequencias com adição de um resíduo ao final da cadeia e exclusão também de um resíduo no início da cadeia por ponto do gráfico. Com este resultado observa-se maior afinidade, valores mais próximos de zero, pelos nonameros gerados a partir do início da sequencia, correspondendo aos fragmentos 1 – 10 até 5 – 14, outra observação de aumento de afinidade é encontrada para os nonâmeros das posições 15 – 24 e 60 – 69, além disto a região terminal da proteína também apresentou maior afinidade em relação às demais nos fragmentos 120 – 133.

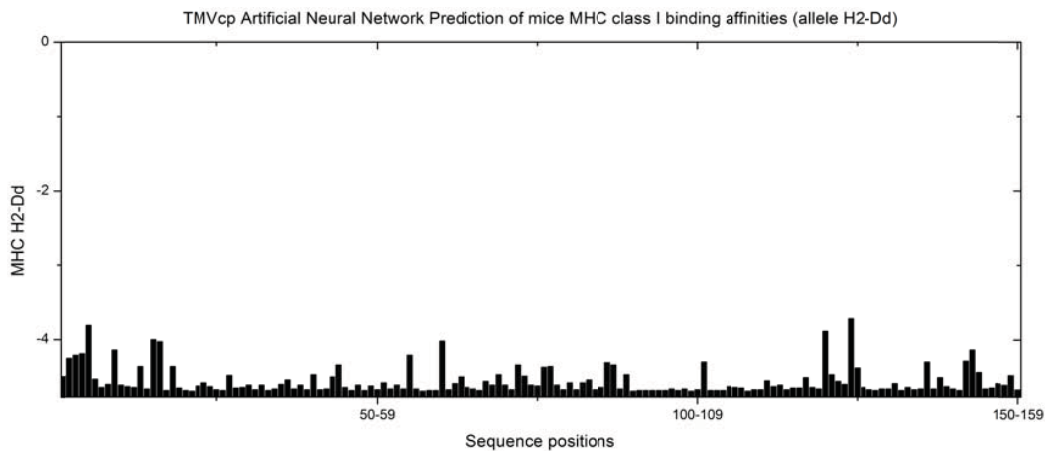


Figura 32: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe I do alelo Balb/C Dd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB.

Os resultados obtidos para o alelo Kd (figura 33) mostraram diferentes afinidades para os nonâmeros gerados em comparação com o alelo descrito acima. Como se observa na figura abaixo, as regiões mais centrais no entorno dos nonâmeros 73 – 81 tiveram afinidades muito altas em relação às demais testadas. Outras regiões com alta afinidade pelo MHC classe I deste alelo foram observadas nas regiões iniciais e finais da proteína. Para os nonâmeros contidos entre os resíduos 3 – 20 e para os contidos entre 110 – 125 o algoritmo reconheceu maiores afinidades de ligação.

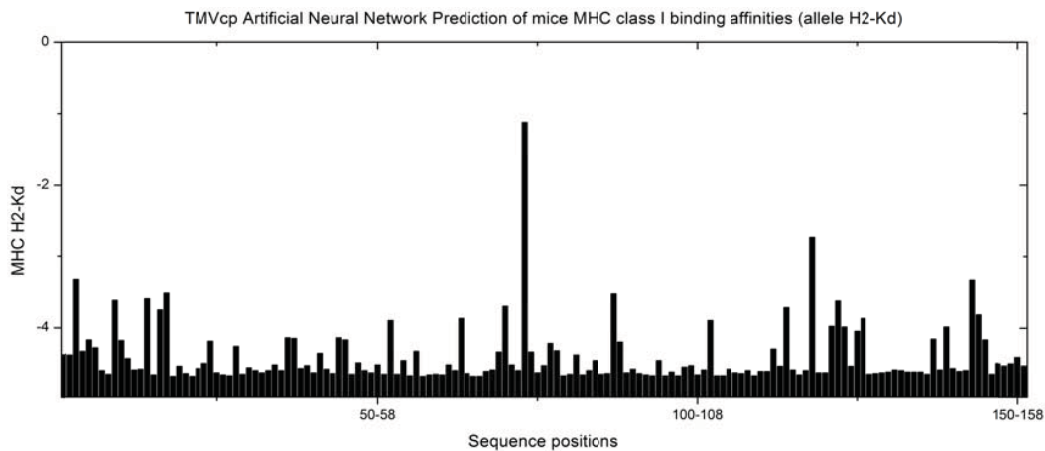


Figura 33: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe I do alelo Balb/C Kd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB.

O alelo Ld quando testado para afinidades pelo algoritmo do IEDB retornou valores de afinidade de ligação menores que os obtidos para os outros dois alelos em média. Exceções foram registradas para as regiões com nonâmeros gerados entre os resíduos 50 – 68 (figura 34).

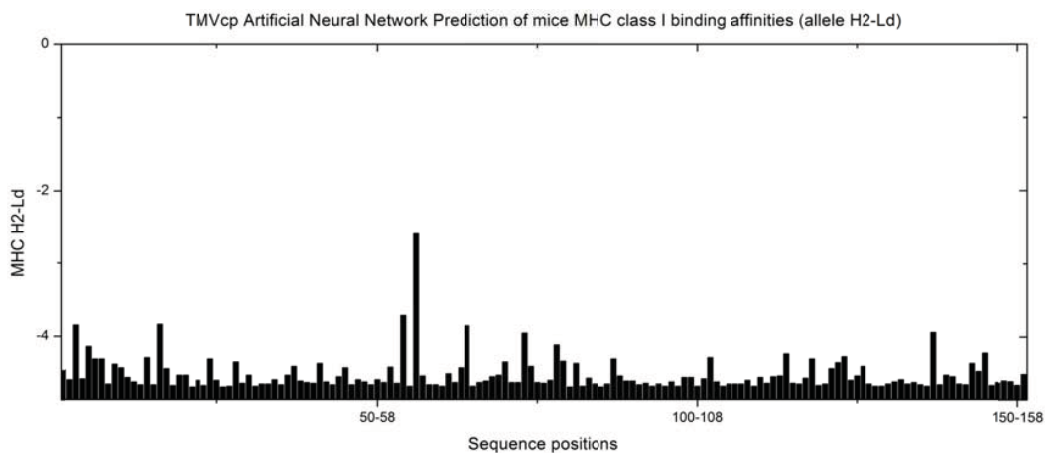


Figura 34: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe I do alelo Balb/C Ld para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB



A Figura 35 mostra os resultados combinados para a análise dos alelos Dd, Ld e Kd através da base IEDB para MHC de classe I de camundongos Balb / c. Estes resultados refletem a afinidade do peptídeo para o complexo MHC com base nas previsões da base de dados. Em todas as três previsões realizadas observa-se uma região que abrange os resíduos 3-16 como tendo uma afinidade elevada. A afinidade da região que incluía os resíduos 60-90 variaram entre as três previsões, mas foi mais elevada no alelo Kd, sugerindo preferência da molécula de MHC gerada por este alelo pelos fragmentos gerados para a TMVcp nesta região. As pontuações para alelos Dd e Kd nesta região eram semelhantes enquanto que a do alelo Ld foi menor, com todos os três alelos mostrando diferentes afinidades de ligação. A pontuação máxima para a predição H2Dd (82-89) foi de -0,4 para -0,2 comparação para a região de resíduos 71-77 Kd e -0,03 para a predição Ld a região de resíduos 79-86. Dos três alelos apenas Ld foi capaz de se ligar virtualmente peptídeos da região que abrange os resíduos 103-110. As regiões terminais TMVcp tinha regiões de ligação semelhantes embora tenha havido uma diminuição progressiva das afinidades de ligação dos alelos Dd, Ld e Kd. As maiores diferenças de pontos de afinidade para os nonâmeros gerados para a TMVcp foram registrados para alelos H2-Kd e H2-Ld. H2-Dd, que tinham pontuações menores quando comparados com os outros alelos e não coincidem com as pontuações mais altas de ligação quando os resultados dos três métodos foram combinados com as contagens totais (figura 35).

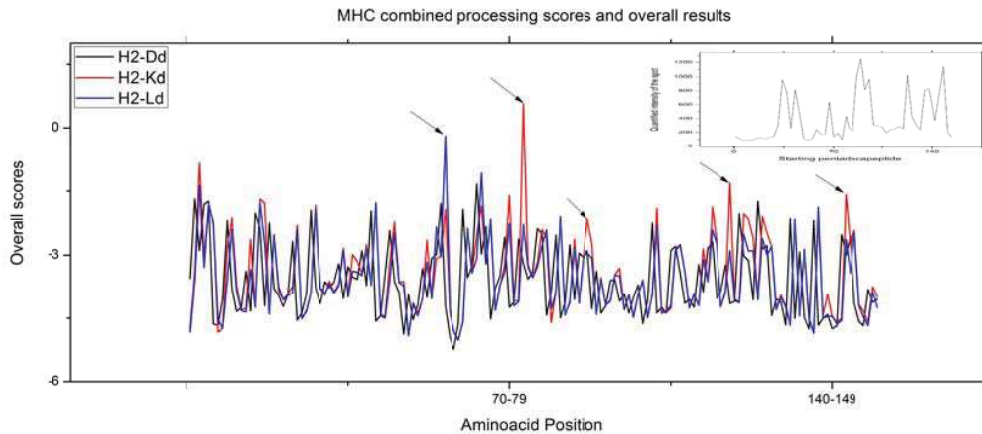


Figura 35: Resultados combinados (clivagem por proteassomo, afinidade por TAP, afinidade por MHC) para os alelos disponibilizados pelo site do IEDB em contraste com o gráfico de intensidade de sinal do mapeamento da forma nativa no *inset*.

#### 5.2.4 Previsão de afinidade de ligação a MHC classe II

As previsões de epítipo para MHC de classe II fornecidas pelo iedb e CBS / Expsy servidores foram utilizados para analisar as respostas possíveis de macrófagos e células dendríticas, a um desafio com TMVcp. A figura 36 mostra os resultados para a predição de cada alelo (IAd e IEd) em camundongos Balb / c. O alelo IAd reconheceu quatro longas regiões como ligantes possíveis para o MHC de classe II, estas regiões também foram detectadas nas nossas experiências camundongos Balb / c imunizados com TMVcp, o que indica que foram importantes em macrófagos e linfócitos T e B e na modulação destas interações. A fenda de ligação do MHC de classe II permite a interação de peptídeos de grande comprimento, até mesmo proteínas completas, desde que o limite de tamanho de 9-15 aminoácidos seja respeitada (282); (283). Interação entre as células de antígenos de processamento (APC) e linfócitos T leva à proliferação celular rápida

e de sinalização celular, como parte da resposta imune. O T CD4 e subsequente comunicação de célula B, que modula a produção de anticorpos e de memória segue regras estritas (284, 285), e o resultado final é a ligação da proteína processada pela fusão endossomo-lisossomo ao complexo MHC de classe II, via CLIP. Como mostrado aqui, as previsões *in silicio* e os dados experimentais produziram resultados coerentes para a ligação da IgG para epítomos da membrana e pontuações mais altas para as regiões correspondentes na predição alelo IAd. Estes achados sugerem que há uma diferença nas afinidades de ligação dos alelos IAD e IED em duas regiões (resíduos 30-70 e 105-115).

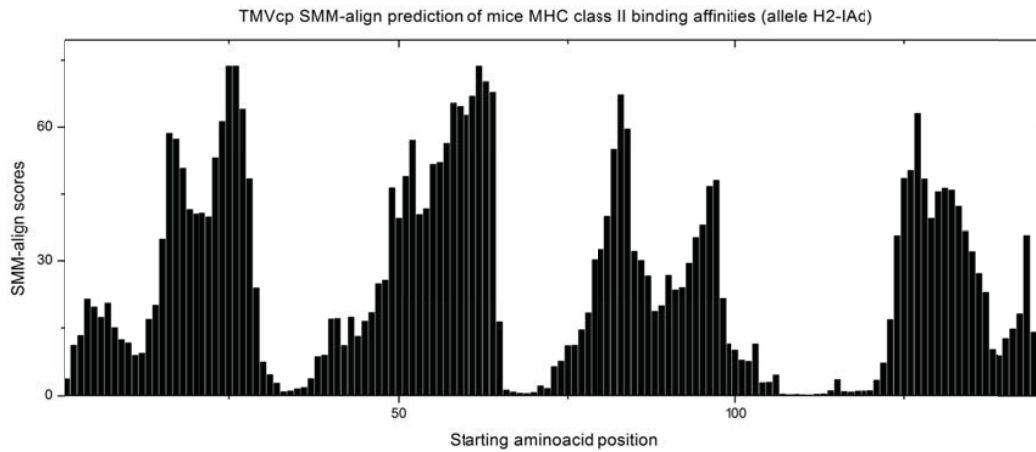


Figura 36: Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe II do alelo Balb/C IAd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB

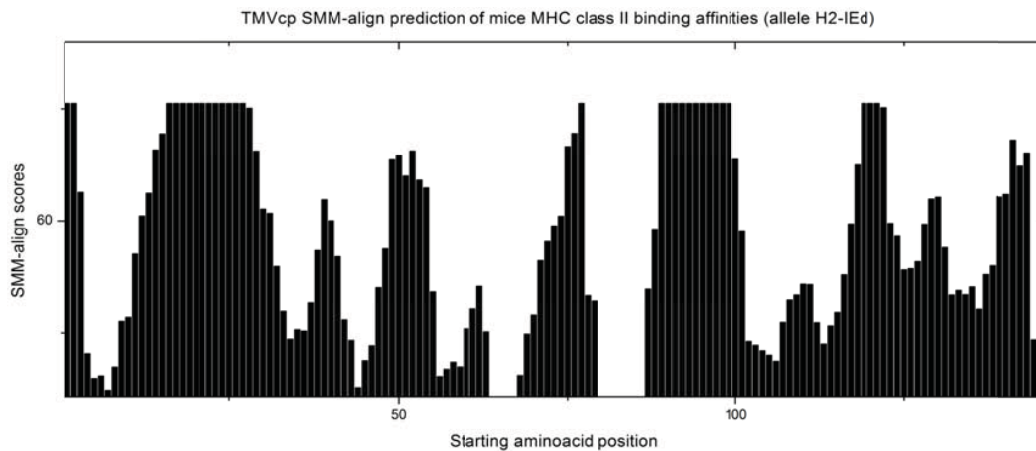


Figura 37 Previsão de afinidades de ligação ao MHC classe II do alelo Balb/C IEd para a TMVcp segundo o algoritmo disponibilizado pelo IEDB

A consideração sobre quais sítios são passíveis de clivagens pelas enzimas relacionadas ao processamento antigênico para MHC classe II levou à análise da sequência da TMVcp frente os padrões de reconhecimento das enzimas em softwares disponíveis online. Estes resultados são apresentados na figura 38. Observa-se para a enzima proteinase K clivagens regulares ao longo da proteína viral. O sítio de clivagem predominante desta enzima é a ligação peptídica adjacente a grupos carboxilos alifáticos e aromáticos dos resíduos em sequência. É comumente utilizada por conta de sua ampla especificidade. Glutamil aminopeptidase é uma aminopeptidase dependente de zinco ligada à membrana que catalisa a clivagem de resíduos de glutamato e aspartato da extremidade N-terminal dos polipeptídeos. Tripsina cliva cadeias peptídicas, principalmente no lado carboxílico dos aminoácidos lisina ou arginina, exceto quando um ou outro é seguido por prolina. As correspondentes clivagens destas enzimas na TMVcp são representadas na figura 38 abaixo.

Glutamyl endopeptidase	7	23 51 96 98 107 132 146
Proteinase K	87	3 5 6 7 11 12 13 14 17 18 19 22 23 24 25 27 29 31 32 36 38 41 43 44 45 49 51 52 53 59 60 61 63 68 70 71 73 75 76 77 80 81 82 83 84 85 87 88 90 94 95 96 97 98 101 104 105 106 107 108 109 111 112 115 118 119 120 121 122 125 126 129 130 131 132 133 134 137 140 145 146 151 152 153 154 158 159
Trypsin	13	42 47 54 62 69 72 91 93 113 114 123 135 142

Figura 38: Previsão de clivagens para as enzimas endossomais de processamento MHC classe II com sítios de clivagem mapeados disponibilizadas no servidor de previsão ExPaSy testadas para a TMVcp.

### 5.2.5 Previsão de epítomos lineares em células B

O software BEpiPred no módulo de previsão de epítomos lineares identificou seis regiões com valores positivos, que correspondem a previsões positivas (figura 39). Algumas destas regiões foram também detectadas pela Spot Synthesis, por exemplo, as regiões formadas pelos resíduos 50-75, 100-115 e 140-155. Este método encontra epítomos lineares baseados na sequência de proteína TMVcp contrastando esta sequência com o banco de dados de reconhecimento experimental nesta modalidade juntamente com o algoritmo probabilístico de previsão. Com base nos resultados fornecidos por este método, a primeira sequência de oito resíduos (3-10; SITTPSQF) correspondem aos primeiro e segundo spots da primeira linha, o segundo epítopo linear identificado possui 24 resíduos (89-112; TRNRRIEVENQANPTTAETLDATR) que correspondem aos spots 2-9 da segunda linha, embora apenas os spots 5 – 9 foram experimentalmente detectados (Figura 1B). O terceiro epítopo linear identificado possui 12 resíduos (146-157; SSGLVWTSSPA) e corresponde aos spots 22-25, dos quais apenas os spots 22 – 24 foram detectados experimentalmente.

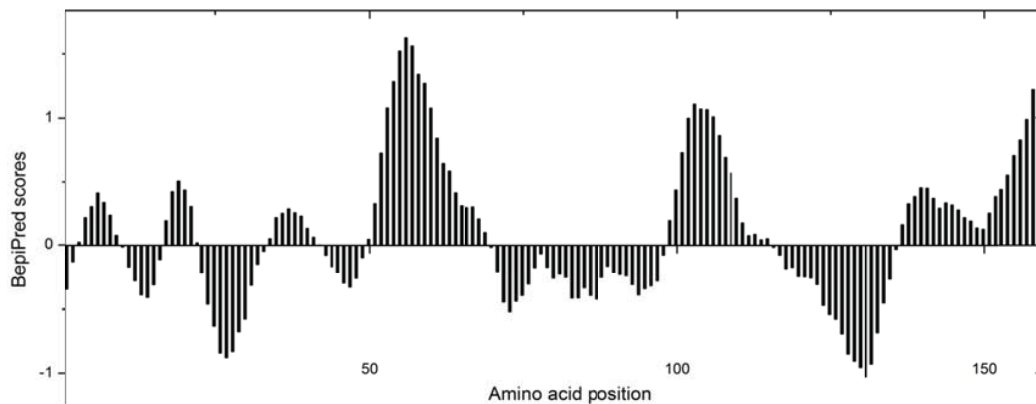


Figura 39: Previsão de reconhecimento e afinidades de epítopos para células B para a sequência da TMVcp.

A sequência TMVcp foi posteriormente mapeada para epítopos descontínuos usando os algoritmos EpiPred e IEDB, com a estrutura cristalizada 3J06 da TMVcp como *query*. A figura 40 mostra a vista anterior (à esquerda) e posterior (direita) da proteína, resultados positivos são apresentados em cores gradativas (azul para vermelho) de acordo com as previsões (BepiPred) (painel A) ou em amarelo nos resultados de previsão pelo algoritmo do IEDB (painel B). Ambos os métodos apresentaram resultados semelhantes. Oito resíduos (7, 37, 39, 43, 47, 50, 134, 147) têm pontos de interação única e de três regiões (63-66, 90-106, 140-143), foram também previstos como descontínuas.

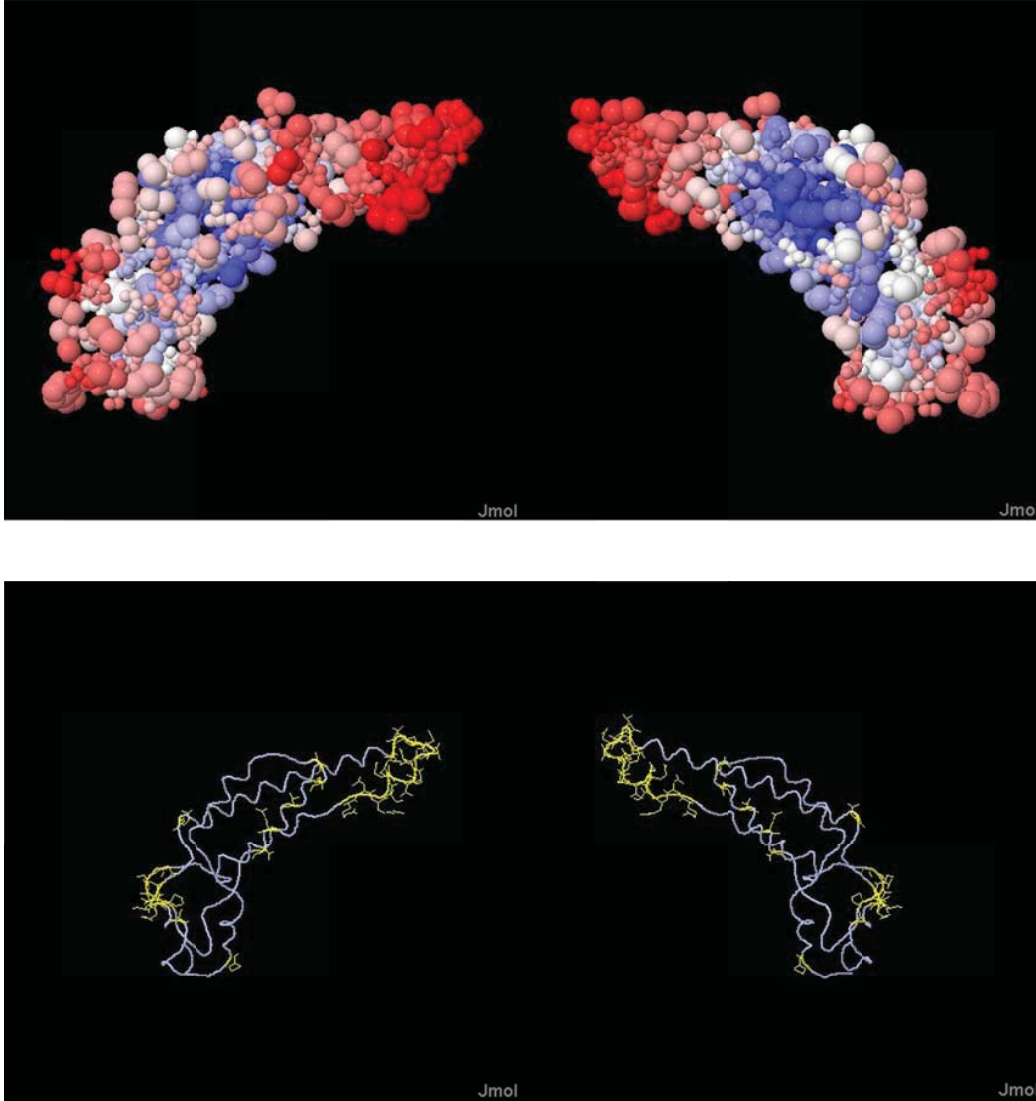


Figura 40: Previsões de epítomos descontínuos via BepiPRED e IEDB em células B para o arquivo 3J06 do Protein Data Bank. Epítomos previstos pelo BepiPRED na TMVcp são indicados em cores (azul: probabilidade de ligação baixa; vermelha: alta probabilidade de ligação).

## **5.3 Resultados experimentais**

### **5.3.1 ELISA**

Os testes de detecção dos anticorpos gerados para a TMVcp estão demonstrados na figura 41. Observa-se variação similar entre os resultados de diluições seriadas dos soros quando testados contra a proteína do capsídeo do TMV. Todos os soros reconheceram a proteína do TMV e mantiveram o perfil de identificação mesmo com os diferentes tratamentos realizados. Em experimentos de identificação de sensibilidade dos anticorpos frente os diferentes tratamentos observa-se menor sensibilidade nas diluições seriadas deste experimento para a TMVcp tratada sob pressão de 250 MPa, cujos índices foram significativamente menores quando comparados ao controle e aos demais testes de alta pressão. A maior sensibilidade aos anticorpos foi observada para o tratamento com uréia seguido da combinação de tratamentos HHP e uréia 1 M, cujos resultados de sensibilidade aproximam-se dos resultados para a forma nativa da proteína (controle). Em termos de sensibilidade para o teste realizado o tratamento pressão e baixa temperatura comportou-se de forma análoga à observada para o tratamento pressão e uréia, com menor sensibilidade, entretanto.

Os resultados para sensibilidade cruzada avaliou o potencial reconhecimento dos anticorpos gerados para um tratamento em contraste com os demais tratamentos, estes resultados são apresentados na figura 42. Observou-se para este experimento que, apesar dos tratamentos alterarem significativamente o perfil de exposição de epítopos, o reconhecimento de determinantes antigênicos



manteve-se inalterado neste teste. Pequenas variações nas detecções podem ser atribuídas a método, sem comprometer a premissa.

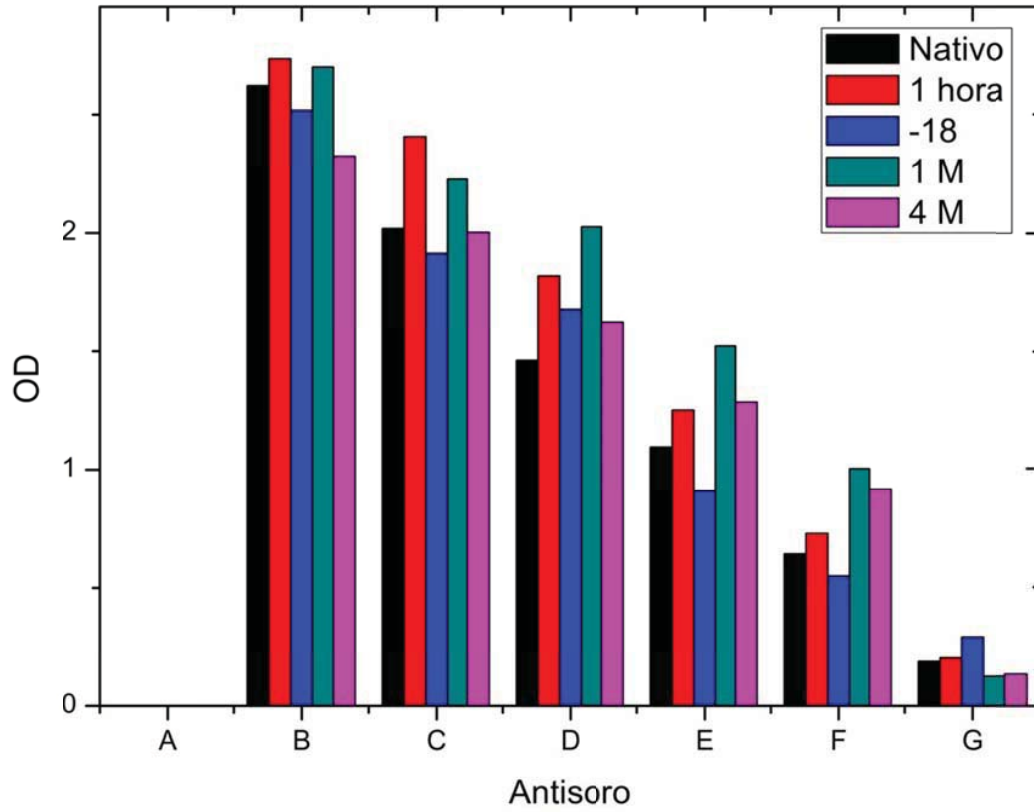


Figura 41: Resultado para testes de diluição seriada de anticorpos em ELISA para a TMVcp nas formas nativa e pós tratamentos.

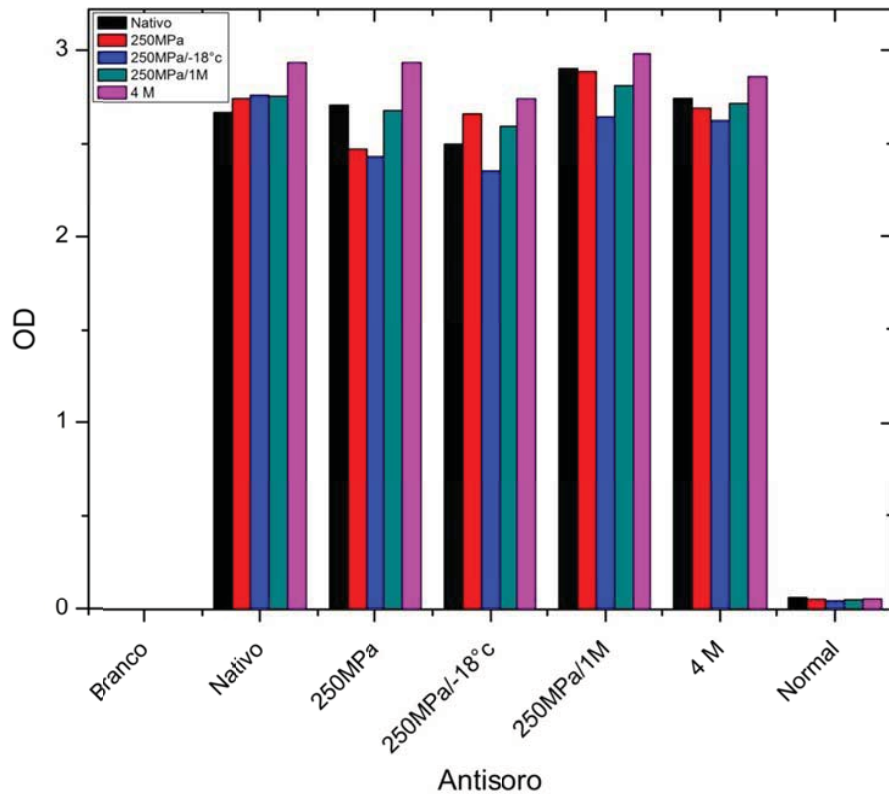
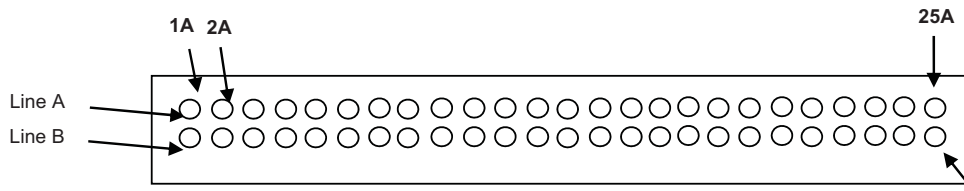


Figura 42: Resultado para testes de sensibilidade cruzada de anticorpos em ELISA para a TMVcp nas formas nativa e pós tratamentos.

## 5.4 Mapeamento de epítomos

Para o mapeamento de epítomos por síntese paralela em membrana utilizou-se o modelo representado pela figura 43 para organização dos pentadecapeptídeos na membrana utilizada na síntese. Cada spot representa, portanto, uma região de síntese de pentadecapeptídeos, estendendo progressivamente para os demais spots à medida que as sobreposições nos pentadecapeptídeos são feitas pelo processo automatizado. Cada soro gerado e analisado pelos experimentos anteriores foi colocado em contato com esta

membrana e o procedimento gerou, ao final do experimento, um sinal quantificado por digitalização pixelada delimitada por campos pelo programa Totallab Quant, módulo spot array. A figura 44 mostra os resultados após revelação com fosfatase alcalina dos spots reconhecidos pelos anticorpos gerados com a forma nativa da TMVcp em contraste com o controle negativo, que interagiu com anticorpos derivados da imunização dos camundongos com parvovírus suíno. Na figura 45 a quantificação da intensidade de sinal do mapeamento da forma nativa foi contrastada com os relatos da literatura para a TMVcp. A figura 46 exibe uma composição dos resultados de mapeamento para cada tratamento.



**Figura 43: Esquema de localizações peptídicas na membrana. Os pentadecaptides correspondentes são apresentados na Figura 45**

O mapeamento de epítomos da forma nativa revelou diferenças significativas entre os resultados da literatura, principalmente para as regiões iniciais da proteína. Observa-se nos resultados, a ausência de sinal nos pentadecapeptídeos iniciais. O reconhecimento dos anticorpos do soro de camundongos imunizados com a proteína em sua forma nativa é observado para os spots A11 a A16, que correspondem às posições 31 a 60, A20 a A23, que correspondem às posições 58 a 81, B5 a B8, que correspondem às posições 88 a 111, B17 a B18, que correspondem às posições 121 a 138 e B21 a B25, que

correspondem às posições 133 a 159. Estes resultados são melhor visualizados na figura 45.



Figura 44: Reatividade dos peptídeos sintetizados em membrana contra de soro de camundongos imunizados com parvovírus suíno (A, controle negativo), em comparação com o soro de camundongos imunizados com TMV nativo (B). Os peptídeos foram gerados a partir da sequência TMVcp em membranas de celulose. Após a incubação com soro, as membranas foram scaneadas e digitalizadas para quantificação dos spots.

A tabela 1 do anexo II apresenta estes resultados novamente, incluindo as posições dos pentadecapeptídeos e juntamente com as interpretações das quantificações densitométricas.

## 5.5 Mapeamento dos tratamentos da TMVcp

As figuras 47 a 50 representam as quantificações, plotadas em gráficos de intensidade por spot mensurado digitalmente, nos tratamentos empregados neste trabalho. Observa-se grande variação no reconhecimento de epítomos de acordo com o soro dos camundongos imunizados que foi analisado. A figura 29 representa a quantificação dos spots após interação com soro gerado a partir da imunização com a forma nativa da TMVcp. Encontramos cinco regiões fortemente reativas: A10-A16 (resíduos 28-60), A20-A23 (resíduos 58-81), B7-B4 (resíduos 85-108), B16-B17 (resíduos 121-138) e B20-B24 (resíduos 133-159), e duas

regiões mais fracas ou menos reativas: A4-A7 (resíduos 10-33) e A25-B1 (resíduos 73-90). As regiões de ligação fortes correspondem a  $\alpha$ -hélices.

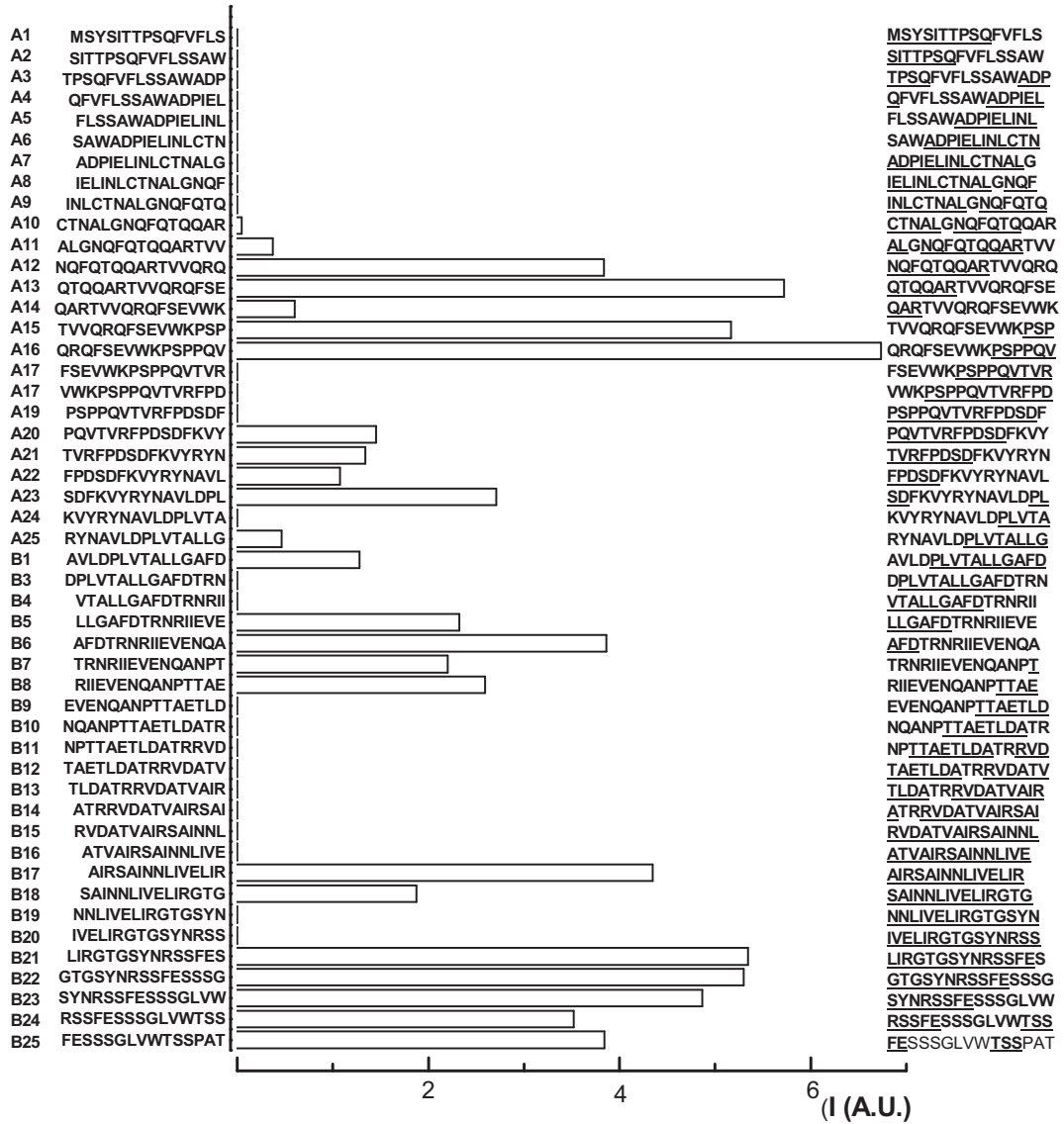


Figura 45: Resultados do mapeamento de epitopos, com base na Figura 43, expressa como a intensidade local em AU (unidades arbitrárias). O comprimento das colunas reflete o grau de imunorreatividade (intensidade local, tal como quantificado com TotalLab Software Quant e corrigido para o controle). Os pentadecapeptides

correspondentes são listados à esquerda e à direita. A aminoácidos sublinhados na direita indicam epítomos identificados em relatórios anteriores (30, 87, 286).

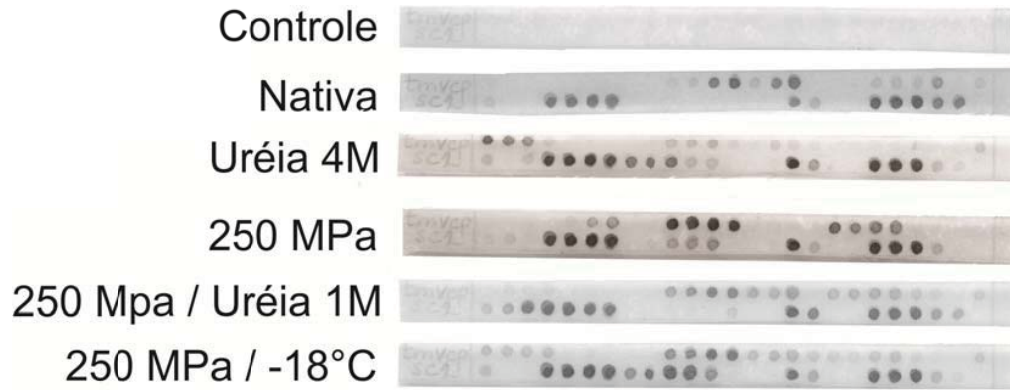


Figura 46: Membranas tratadas com os soros dos camundongos imunizados com os tratamentos da TMVcp listados à esquerda de cada membrana.

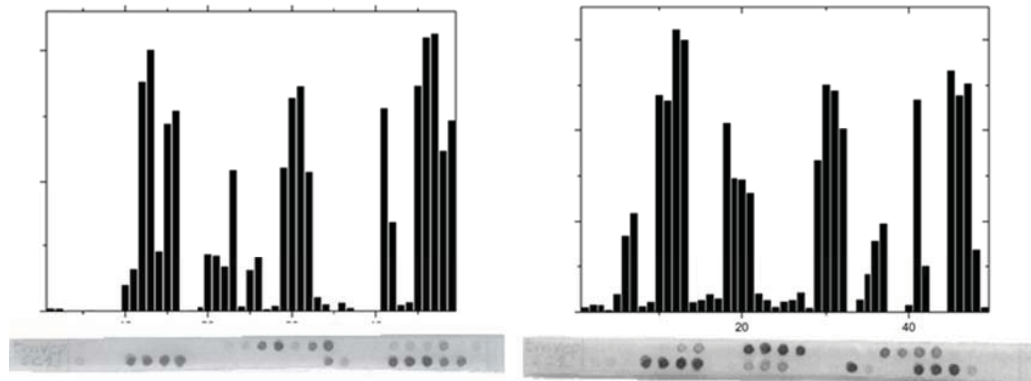


Figura 47: Comparação do mapeamento da forma nativa *versus* o tratamento com alta pressão

Em comparação ao mapeamento da forma nativa o mapeamento do tratamento da TMVcp com pressão de 250 MPa reconheceu como epítomos diferenciais os spots 6 – resíduos 16 a 30 (SAWADPIELINLCTN), 7 – resíduos 19 a 33 (ADPIELINLCTNALG), 18 – resíduos 52 a 66 (VWKPSPPQVTVRFPD), 19 - resíduos 55 a 69 (PSPPPQVTVRFPDSDF), 35 – 37 – resíduos 103 a 123

(NPTTAETLDATRRVD, TAETLDATRRVDATV, TLDATRRVDATVAIR). O mesmo tratamento falhou em reconhecer os epítomos da forma nativa nos spots 14 – 16 - resíduos 40 a 60 (QARTVVQRQFSEVWK, TVVQRQFSEVWKPSP, QRQFSEVWKPSPPQV), 22 – 23 – resíduos 64 a 84 (FPDSDFKVYRYNAVL, SDFKVYRYNAVLDP) e 25 a 26 – resíduos 73 a 90 (RYNAVLDPVLTALLG , AVLDPLVTALLGAFD). A tabela 1 relaciona estes resultados.

**Tabela 1: Epítomos diferenciais encontrados na comparação dos mapeamentos da forma nativa em contraste com a forma tratada sob alta pressão.**

Posição	Sequencia	Posição inicial - final		Nativo	HHP 250 MPa	
6	SAWADPIELINLCTN	16	a	30	+	
7	ADPIELINLCTNALG	19	a	33	++	
10	CTNALGNQFQTQQAR	28	a	42	+	++++
11	ALGNQFQTQQARTVV	31	a	45	+	++++
18	VWKPSPPQVTVRFPD	52	a	66		+++
19	PSPPQVTVRFPDSDF	55	a	69		+++
22	FPDSDFKVYRYNAVL	64	a	78	+	
23	SDFKVYRYNAVLDP	67	a	81	++	
35	NPTTAETLDATRRVD	103	a	117		+
36	TAETLDATRRVDATV	106	a	120		++
37	TLDATRRVDATVAIR	109	a	123		++
49	FESSSGLVWTSSPAT	145	a	159	++++	

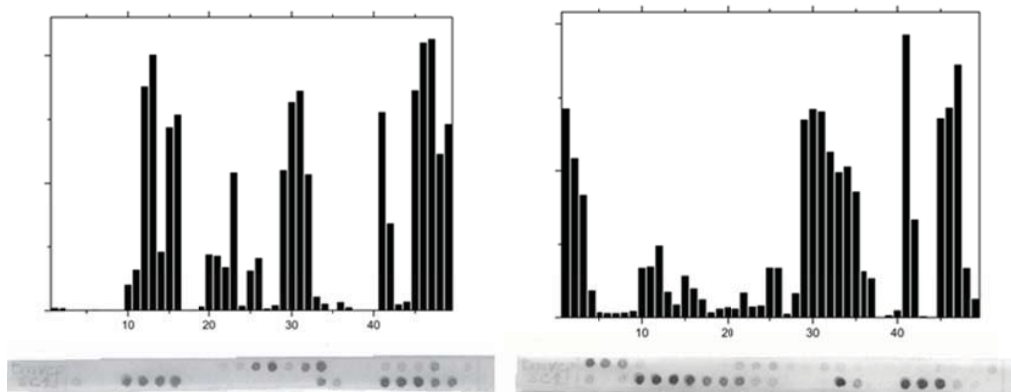


Figura 48: Comparação do mapeamento da forma nativa *versus* o tratamento com uréia 4 M

Em comparação ao mapeamento da forma nativa o mapeamento do tratamento da TMVcp com ureia 4 M reconheceu como epítomos diferenciais os spots iniciais da proteína, 1 a 4, 33 a 37. Por outro lado o mapeamento falhou em reconhecer os epítomos dos spots 13 – resíduos 37 a 51 (QTQQARTVVQRQFSE), 14 – resíduos 40 a 54 (QARTVVQRQFSEVWK), 16 – resíduos 46 a 60 (QRQFSEVWKPSPPQV), 20 – 23 – resíduos 58 a 81 (PQVTVRFPDSDFKVY, TVRFPDSDFKVYRYN, FPDSDFKVYRYNAVL, SDFKVYRYNAVLDP). A tabela 2 relaciona estes resultados.

Tabela 2: Epítomos diferenciais encontrados na comparação dos mapeamentos da forma nativa em contraste com a forma tratada com uréia 4 M.

Posição	Sequencia	Posição inicial - final		Nativo	Uréia 4M
1	MSYSITTPSQFVFLS	1	a 15		++++
2	SITTPSQFVFLSSAW	4	a 18		+++
3	TPSQFVFLSSAWADP	7	a 21		++
14	QARTVVQRQFSEVWK	40	a 54	+	
15	TVVQRQFSEVWKPSP	43	a 57	++++	
16	QRQFSEVWKPSPPQV	46	a 60	++++	
20	PQVTVRFPDSDFKVY	58	a 72	+	



21	TVRFPDSDFKVYRYN	61	a	75	+	
22	FPDSDFKVYRYNAVL	64	a	78	+	
23	SDFKVYRYNAVLDP	67	a	81	++	
33	EVENQANPTTAETLD	97	a	111		+++
34	NQANPTTAETLDATR	100	a	114		+++
35	NPTTAETLDATRRVD	103	a	117		+++
36	TAETLDATRRVDATV	106	a	120		+
37	TLDATRRVDATVAIR	109	a	123		+

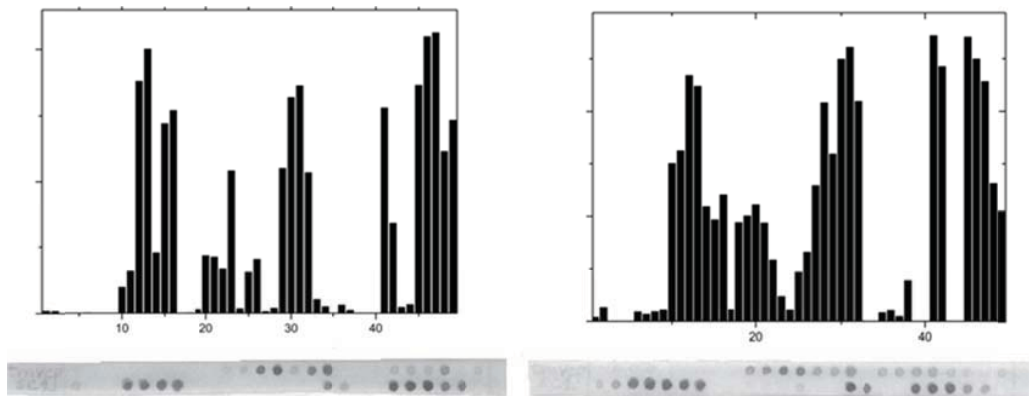


Figura 49: Comparação do mapeamento da forma nativa *versus* o tratamento com alta pressão e uréia 1 M

Em comparação ao mapeamento da forma nativa o mapeamento do tratamento da TMVcp com pressão e uréia 1 M reconheceu como epítomos diferenciais os spots iniciais da proteína, 18 a 19 - resíduos 52 a 69 (VWKPSPPQVTVRFPD, P SPPQVTVRFPD SDF) e 28 a 29 – resíduos 82 a 99 (VTALLGAFDTRNR II, LLGAFDTRNR IIEVE). Por outro lado o mapeamento deste tratamento reconheceu os epítomos da forma nativa com maior intensidade de sinal que o mapeamento original. A tabela 3 relaciona estes resultados.

Tabela 3: Epítopos diferenciais encontrados na comparação dos mapeamentos da forma nativa em contraste com a forma tratada com alta pressão e uréia 1 M.

Posição	Sequencia	Posição inicial - final		Nativo	HHP e ureia 1M
17	FSEVWKPSPPQVTVR	49	a 63		+
18	VWKPSPPQVTVRFPD	52	a 66		+++
19	PSPPQVTVRFPDSDF	55	a 69		+++
24	KVYRYNAVLDPVTA	70	a 84		+
25	RYNAVLDPVTALLG	73	a 87		++
26	AVLDPVTALLGAFD	76	a 90		++
27	DLPVTALLGAFDTRN	79	a 93		+++
28	VTALLGAFDTRNRII	82	a 96		++++

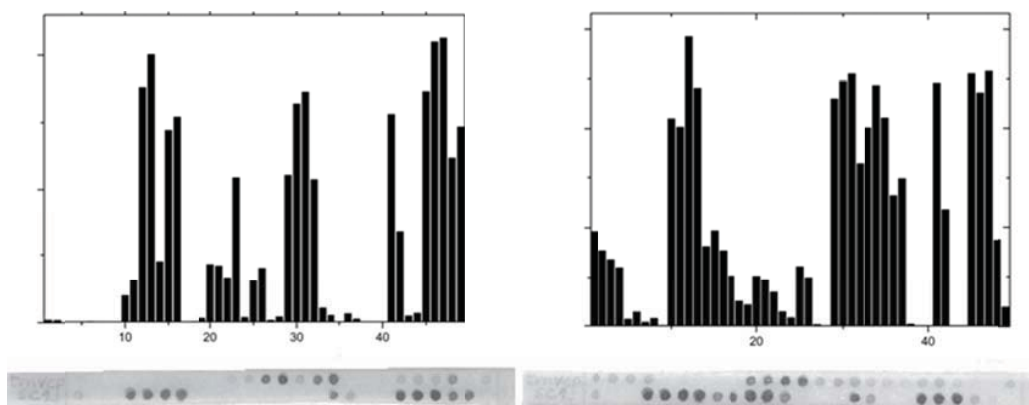


Figura 50: Comparação do mapeamento da forma nativa *versus* o tratamento com alta pressão e baixa temperatura

Em comparação ao mapeamento da forma nativa o mapeamento do tratamento da TMVcp com pressão e baixa temperatura reconheceu como epítopos diferenciais os spots iniciais da proteína, 1 a 4 - resíduos 1 a 24 (MSYSITTPSQFVFLS, SITTPSQFVFLSSAW, TPSQFVFLSSAWADP, QFVFLSSAWADPIEL), 18 a 19 - resíduos 52 a 69 (VWKPSPPQVTVRFPD, PSPPQVTVRFPDSDF) e 33 a 37 – resíduos 97 a 123 (EVENQANPTTAETLD,

NQANPTTAETLDATR, NPTTAETLDATRRVD, TAETLDATRRVDATV, TLDATRRVDATVAIR). A tabela 4 relaciona estes resultados.

**Tabela 4: Epitopos diferenciais encontrados na comparação dos mapeamentos da forma nativa em contraste com a forma tratada com alta pressão e baixa temperatura.**

Posição	Sequencia	Posição inicial - final		Nativo	HHP e Baixa temperatura
1	MSYSITTPSQFVFLS	1	a 15		++
2	SITTPSQFVFLSSAW	4	a 18		++
3	TPSQFVFLSSAWADP	7	a 21		++
4	QFVFLSSAWADPIEL	10	a 24		++
17	FSEVWKPSPPQVTVR	49	a 63		+
18	VWKPSPPQVTVRFPD	52	a 66		+
19	PSPPQVTVRFPDSDF	55	a 69		+
33	EVENQANPTTAETLD	97	a 111		+++
34	NQANPTTAETLDATR	100	a 114		++++
35	NPTTAETLDATRRVD	103	a 117		++++
36	TAETLDATRRVDATV	106	a 120		++++
37	TLDATRRVDATVAIR	109	a 123		+++

## 6 Discussão

Existe um grande volume de informações estruturais para o TMV, particularmente a TMVcp. Neste estudo, utilizou-se a tecnologia da síntese local de peptídeos para mapear os epítomos da TMVcp que foram reconhecidos naturalmente e também após tratamentos de alta pressão, contrastando-os com previsões de bioinformática para interação com possíveis epítomos reconhecidos por células B e T. As propriedades estruturais do TMVcp previstas por bioinformática também foram utilizados para apoiar os nossos resultados experimentais.

A literatura fornece bastante informação sobre o perfil antigênico da proteína do capsídeo do TMV. Vários autores mapearam a proteína purificada para identificar epítomos que são reconhecidos, em diferentes modelos animais (87, 91, 103, 308, 309).

Nas nossas experiências, não encontramos ligação significativa nos primeiros 42 peptídeos da TMVcp, em contraste com resultados anteriores, para os primeiros 10 peptídeos (308) e para os peptídeos 19-32 (103), utilizando soros policlonais. Os resultados coincidem com a literatura para as regiões positivas encontrados em nosso experimento. As regiões descritas como positivas 34 – 39 (308), 55 – 61 (310) e 62-68 (309). Os nossos resultados detectaram interação com a região 31-60, com sinais mais fortes de ligação localizados na região 34 – 51 e 43 – 60. A região localizada entre peptídeos 58 até 81 é também descrita como positiva pelos soros policlonais (região 55-61 e 62 a 68). Posições

encontradas por ambos os anticorpos poli e monoclonais (MAbs) na literatura correspondem às regiões dos peptídeos 80-90, 105-112, 115-134, 134-146 e 153-156 (88, 90, 104). Os nossos resultados mostraram reação positiva para a região 85-108 com sinal mais intenso na região dos resíduos 88-102 (spot 30). Não encontramos ligação na região a partir de resíduos 97-132, em contraste com os resultados anteriores (88, 289), mas de acordo com outros relatos (90, 104) para as regiões dentro de resíduos 121-144 (spots 41 e 42) e 133 a 159 (spots 45 a 49).

No que diz respeito ao modelo utilizado para investigar o perfil antigênico de TMV de acordo com Anderer, que usou peptídeos trípticos e um ELISA fixo do sistema de detecção do complemento com anticorpos policlonais e monoclonais para este fim (90). O trabalho de Al Moudallal com soros utilizados de frango imunizado e MAbs (104), e Altschuh e Van Regenmortel verificou o problema no mapeamento de epítomos de uma proteína por meio de MAbs (310). Outros relatos confirmaram depois que proteínas mais longas devem ser usadas a fim de tratar corretamente o processo de apresentação de antígeno (98, 102, 311). A técnica de Spot Synthesis permite que isso seja feito e, com a estratégia de restringir os experimentos para um modelo de camundongos em combinação com previsões de epítomos especificamente para este modelo animal fornece uma estratégia de mapeamento rápido e preciso dos epítomos de uma dada proteína.

Os determinantes antigênicos de proteínas são geralmente localizados em regiões expostas polares, hidrofílicas. Por conseguinte, a acessibilidade e a

flexibilidade destes segmentos são maiores do que as de outros epítomos potenciais localizadas mais profundamente na estrutura tridimensional da molécula. Como mostrado aqui, o gráfico Kyte-Doolittle da sequência TMVcp revelou que as regiões envolvendo os resíduos de aminoácidos 30-78, 80-120 e 130-150 possuem estas características. Estas regiões correspondem aos epítomos com maiores intensidades de ligação, identificados nas análises de previsão. Resultados semelhantes foram descritos em outro relato utilizando diferentes métodos, menos precisos e em modelos animais distintos (30, 87, 98, 286).

Vários estudos têm demonstrado a correlação entre os dados experimentais e os resultados de previsão de bioinformática para processos complexos, como clivagem proteossomal, a TAP afinidade de ligação e de ligação do MHC (228, 244, 293, 304, 312-314). Uma correlação semelhante foi também observada aqui para a ligação de peptídeos derivados da TMVcp frente MHC de Classe I e de Classe II em camundongos. Considerando a limitação espécie-específica do TMV em camundongos, é pouco provável que outros mecanismos que não a via de processamento intracelular por endocitose de antígenos estejam envolvidos, ou seja, provavelmente há ativação de células de processamento de antígenos (APC), tais como macrófagos e células dendríticas, responsáveis por apresentação cruzada de antígenos. Neste contexto, as previsões para proteassomo / TAP / MHC I no presente estudo foram realizadas para efeitos de comparação, embora as células dendríticas realizem autofagia e expressem ambas as classes de MHC (163, 315, 316). Os alelos Balb / c aqui escolhidos para os processos de previsão *in silicio* foram escolhidos de acordo com a

disponibilidade de algoritmos para este modelo. Muitos estudos demonstraram o efeito das substituições de aminoácidos na função de proteínas, por exemplo, o efeito de mutações na actividade de polimerase de influenza A (317, 318). Modificação de proteínas do capsídeo pode gerar um vírus defeituoso e, conseqüentemente, à incapacidade de automontagem da partícula do vírion, impedindo assim a novas infecções (319, 320).

Características como propensão à hidrofobicidade, flexibilidade e acessibilidade, a presença de voltas e hélices, superfície exposta em termos de polaridade, e previsões sobre antigenicidade foram parâmetros utilizados para prever epítomos nos algoritmos empregados e para análise da sequencia. Em geral, as hélices ocorrem na superfície das proteínas e são geralmente acessíveis e hidrofílicas. Em contraste, o núcleo é essencialmente desprovido de moléculas de água (237). No caso da proteína do capsídeo VP5 do vírus herpes simplex tipo I a estrutura secundária é importante para a ligação do anticorpo e mesmo pequenas modificações podem afetar a identificação do antígeno pelo sistema imune (321, 322). A TMVcp tem três grandes regiões hidrofílicas que abrangem os resíduos 30-70, 90-120 e 140-150; todas as três regiões também foram reconhecidas no mapeamento da forma nativa.

Com base nos resultados de ligação de IgG de camundongos à membrana dos epítomos TMVcp, observou-se sinal nos resíduos 31-60, 85-108 e 133-159. As ferramentas disponibilizadas pelo IEDB mostram que essas regiões tiveram maior probabilidade de clivagem proteosomal. Estes resultados foram complementados

com as previsões da afinidade de ligação a TAP. As previsões de ligação a MHC de classe I consideraram os resultados combinados destes três métodos de previsão bem como os alelos utilizados, que incluem apenas três alelos do MHC (Dd, Kd e Ld) disponíveis. A variação na ligação prevista observada com este método provavelmente reflete diferenças estruturais que influenciaram interações entre MHC-peptídeo (323). Neste contexto, a análise *in silicio* revelou diferentes ligações possíveis para cada alelo testado. O servidor CBS analisa individualmente os resíduos enquanto que os algoritmos do IEDB empregam 9-meros na análise de cada alelo, para as três regiões antigênicas principais identificadas experimentalmente.

Estas três regiões antigênicas foram avaliadas também com o IDEB e servidores CBS frente software de predição para MHC de classe II. As regiões previstas com ligação de alta afinidade também foram encontradas no mapeamento da forma nativa. Peptídeos derivados do segmento contendo resíduos 37-69 apresentaram menores escores IC50 pelo método SMM para o alelo IAd enquanto que para o alelo IEd a proteína foi quase que completamente reconhecida como possíveis epitopos. Neste último caso, os epitopos foram previstos compreendendo os resíduos 34-85.

O software de previsão de células B encontrou a região dos resíduos 46-66 com alta probabilidade de ligação, concordando com nossos resultados experimentais. A predição de epítipo descontínuos reconhecidos por células B encontrou nesta mesma região um fragmento maior com alta probabilidade (que



se estende do resíduo 33 a 90), com dois resultados de maior afinidade previstos para esta região. Estes dois picos são separados por poucos resíduos (61-63), o que diminui acentuadamente a probabilidade de ligação, de acordo com o algoritmo utilizado.

As células B são de particular interesse porque os seus receptores de superfície são formados por rearranjo mediado por IgG. Por conseguinte, os epítomos reconhecidos por IgG positivas e possivelmente apresentados via MHC II são importantes em combinação com as previsões de células B, considerando a comunicação entre estas células e APCs. Esta possibilidade foi examinada usando vários motores de predição de epítomos B. Como resultado, cinco regiões da TMVcp foram previstas. O menor epítomo encontrado está na região inicial da sequência 18-20, enquanto a mais longa encontra-se nos resíduos 52-64.

Os resultados de previsão aqui descritos, de acordo com outros relatórios para este vírus e dados de centros de referência em estudos TMV, suportam os nossos resultados de spot synthesis, no entanto, os epítomos que identificamos nos diferentes tratamentos não foram previstos diretamente, sugerindo discordância entre estes resultados e os algoritmos de previsão. Em camundongos Balb / c, os primeiros dez pentadecapeptídeos da TMVcp não foram reconhecidos. Van Regenmortel e cols (1999) relataram que estas regiões são importantes epítomos. No entanto, a utilização de vários modelos diferentes, para obter os resultados descritos por estes autores pode ter levado a diferentes

respostas imunes contra o mesmo antígeno (como mostrado para o MHC de classe I alelos em Balb / c), tornando difícil a interpretação dos resultados.

Informações sobre os efeitos da alta pressão sobre biomoléculas têm sido relativamente escassas até o momento. Os avanços recentes nas técnicas analíticas de estudo de proteínas sob pressão têm facilitado a investigação de interações moleculares internamente em proteínas e em complexos de proteínas, fornecendo novas perspectivas para a estrutura e função de biomoléculas, em condições de pressões elevadas. Além disso, como o efeito da pressão em proteínas geralmente é distinto se comparado aos gerados por temperatura, condições desnaturantes de pH, a pressão é considerada como uma variável importante para a análise de relações entre estrutura e função de proteínas (201, 215).

A pressão é reconhecida como um potencial agente desnaturante de proteínas há algum tempo, no entanto, a gama de variações de pressão para desnaturação de proteínas difere, dependendo das características estruturais da proteína, mas é aplicada em larga escala em virologia. Considerando que as estruturas primárias e secundárias de proteínas não são alteradas mediante pressões tão elevadas como 10 kbar, proteínas oligoméricas podem facilmente dissociar a pressões inferiores a três kbar (201, 210, 215, 337, 338, 344).

Em geral, o efeito de pressão sobre um processo físico-químico, em equilíbrio, é regido pela alteração de volume do processo,  $\Delta V$ . Assim, a aplicação de pressão fará com que o equilíbrio mude em favor do estado com o menor

volume geral. A magnitude de sinal em  $\Delta V$  para alterações na estrutura da proteína dependerá de interações moleculares específicas (201, 215).

Devido à capacidade de dissociar proteínas oligoméricas de forma reversível, o tratamento com HHP elevou-se como um método alternativo para a inativação viral, considerando o contexto de desenvolvimento de vacinas. Postula-se que a dissociação reversível das proteínas do capsídeo viral causa, na automontagem subsequente, partículas virais associadas imperfeitamente, evento este que já foi associado à perda de infecciosidade, enquanto conserva, ao mesmo tempo, ou ainda melhorando, a imunogenicidade das proteínas de interesse (48, 216, 336, 359). Em nosso trabalho, observamos estas alterações indiretamente no mapeamento dos epítomos para as proteínas tratadas sob pressão, com diferentes regiões disponibilizadas para processamento e reconhecimento antigênico, providas pelo modelo animal empregado. É importante ressaltar que não apenas as regiões mais expostas ao solvente são mais acessíveis aos sistemas de processamento antigênico, como descrito por Carmicle (360) e revisto por Neefjes (163), a restrição de afinidade ao MHC pelos alelos que os codificam é bem conhecida, em detalhes que permitiram a criação de modelos de ligação e mecanismos de previsão – como os aqui empregados. Assim, conformação tridimensional da proteína é fator decisivo também na apresentação de antígenos, mas depende da combinação de fatores imunológicos para determinação de quais epítomos serão relevantes para uma dada proteína, como, por exemplo, a questão de imunodominância para CD4, que não é explicada totalmente pela seletividade de epítomos. Por esta razão o estudo de

sítios de clivagem das enzimas responsáveis pelo processamento de antígenos são incorporados nos modelos de previsão e também podem ser inferidas a partir de estudos como o mapeamento extensivo do reconhecimento antigênico aplicado neste trabalho. De forma geral a estrutura tridimensional limita o acesso da proteína processada ao MHC, como em exemplo descrito por Thai (361), onde eventos de acidificação endossomal contribuem para a desestabilização da proteína, além de muitos outros estudos que, em consenso, sugerem que a via de processamento do antígeno determina a imunodominância dos epítomos (362).

Como afirmado por Hubbard: “A clivagem endoproteolítica tende a ocorrer em segmentos polipeptídicos desordenados, graças à conformação dos segmentos em relação aos sítios ativos das enzimas” (363, 364) a relação entre forma e processamento é determinante na apresentação de antígenos. Além disto, a imunodominância também está relacionada à espécie estudada, de acordo com Dai, sugerindo ainda que o encurtamento de um peptídeo desordenado, por clivagens ou por condição estrutural, pode reduzir a imunogenicidade de um epítomo associado ou adjacente (365, 366). Neste sentido, a identificação de regiões mais prováveis de influencia tridimensional no reconhecimento de epítomos se dá em porções flexíveis da proteína, em alças móveis. Compreendendo dois mecanismos distintos, portanto, de geração de epítomos restritos a MHC classe II, a via protease-dependente – que sofre interferência tridimensional na apresentação e a via protease-independente, que liga o epítomo, sem processamento enzimático, diretamente ao MHC II (367).

Neste contexto algumas características das proteínas devem ser consideradas, quando o tratamento sob pressão é empregado. A ação da pressão é distinta da temperatura, poucos kbar são capazes de desnaturar proteínas. Em condições ambiente para pressão e temperatura, pequenas variações resultam em comportamentos elásticos da proteína e em casos com grandes elevações em pressão ou temperatura ocorrem alterações plásticas ou conformacionais (368). Observamos alterações deste tipo nos tratamentos empregados, principalmente nas condições desnaturantes de ureia, nestes tratamentos relatamos o reconhecimento do soro dos camundongos tratados em regiões diferentes daquelas identificadas no experimento com a forma nativa da TMVcp. Na comparação dos resultados dos mapeamentos para os tratamentos e com a forma nativa – estabelecida como referencia para interpretação do perfil normal de reconhecimento – e utilizando dados da predição de epítomos para a estrutura cristalográfica da proteína viral foi possível inferir sobre regiões que foram expostas na superfície e que, portanto, permitiram reconhecimento e produção de sinal.

Em condições de elevada pressão ou temperatura ocorrem mudanças chamadas cooperativas na estrutura secundária da proteína causando o efeito plástico. Na expansão térmica o volume molar é alterado, causando distensão das regiões flexíveis da proteína e desnaturando-a. Outro componente mensurável é a compressibilidade isotérmica, derivada de alterações em volume e pressão. Ambos são derivados das cavidades da proteína – geradas pela composição de aminoácidos em relação à polaridade e hidrofobicidade individual e também

hidratação destas regiões na estrutura proteica. Linhas gerais podem ser definidas em termos de compressibilidade – negativa por ser dependente da interação soluto-solvente (proteína-agua) e em termos de cavidades – que compensam o efeito citado ao longo da estrutura tornando a compressibilidade positiva (201, 215).

Para testar a hipótese da interferência da conformação proteica no processamento antigênico Dai e cols. inseriram mutações em pontos chave da proteína e mapearam o reconhecimento antigênico destas alterações por western blot. Observaram que as deleções inseridas reduziram o tamanho dos epítopos e também a sensibilidade à proteólise das regiões onde a conformação foi postulada como interferente no processamento, implicando na redução da imunogenicidade de epítopos dominantes. Estes autores propõem então que a distribuição da flexibilidade local em antígenos dobrados e estáveis influencia o processamento e apresentação mais que a sequência primária da proteína. Epítopos protease-independentes seriam restritos a regiões flexíveis da proteína enquanto epítopos protease-dependentes são retidos por limitação estrutural – podendo esta ser desestabilizada por proteólise. Segundo os autores epítopos tendem a ocorrer em regiões que flanqueiam áreas flexíveis e não em porções centrais de segmentos de peptídeos (365, 366, 369-372).

Neste sentido muitos estudos já avaliaram a alteração de funções induzida por pressão em proteínas, o primeiro estudo com espectroscopia vibracional (RAMAN) com lisozima alterada por pressão revelou que a alta pressão induziu

um estado *unfolded* e que esta condição era irreversível, diferente do observado com técnicas de fluorescência (373). O mesmo foi observado em estudos com quimiotripsina (374). Este estado desdobrado (*unfolded*), induzido por pressão, gerou alterações intermoleculares que impediram a reversibilidade do estado, principalmente nas interações geradas por pontes de hidrogênio.

No tratamento com alta pressão apenas observou-se regiões diferenciais, ou seja, quando em contraste com o mapeamento da forma nativa, novos epítomos foram reconhecidos. Estas regiões são discutidas abaixo.

Houve deslocamento do sinal para os primeiros penta decapeptídeos da composição em dois tratamentos, alta pressão e baixa temperatura e no tratamento com ureia 4 M. Estes epítomos são descritos na literatura, mas não foram observados no mapeamento da forma nativa. Correspondem às seguintes sequências MSYSITTPSQFVFLS, SITTPSQFVFLSSAW, TPSQFVFLSSAWADP e QFVFLSSAWADPIEL os aminoácidos iniciais da TMVcp para os spots 1 a 4. A análise de área de superfície acessível para esta região afirma que apenas os aminoácidos da posição 3 a 15 são expostos na superfície, ao passo que, para os demais aminoácidos sintetizados nestes spots, os resultados apontam para internalização dos resíduos. Os algoritmos de previsão de hidrofobicidade e antigenicidade para esta região mostram que este fragmento inicial é hidrofílico e antigênico e a combinação de previsões para MHC I e II concorda com a possibilidade de apresentação destes epítomos. Na análise de clivagem pelo proteassomo os aminoácidos 14 e 15 são altamente susceptíveis à proteólise,

mas, de acordo com a estrutura depositada no PDB, análise da estrutura secundária da proteína – região de folha beta, com os resultados negativos de mapeamento da forma nativa sugere-se que, na conformação nativa, esta região não é facilmente acessada pelo sistema de processamento e, portanto, estes tratamentos permitiram a apresentação destes epítomos para os sistemas de memória adaptativa. Entretanto, os dados de afinidade para TAP apontam para grande probabilidade de ligação à região. Os alelos de MHC I diferem quanto à afinidade, o alelo H2-Dd possui maior afinidade para os resíduos 1 a 5 e 16 a 24; o alelo Kd concorda com a previsão anterior, mas expande a afinidade para a região 16 a 25 bem como o alelo Ld. Na previsão para MHC II a região contida entre os resíduos 12 a 29 analisada pelo algoritmo IEDB para o alelo IAd retornou os maiores valores para probabilidade de afinidade do teste. Esta região (spots 5 a 7 – resíduos 13 a 33) não corresponde – segundo a literatura e de acordo com as análises *in silicio*, a epítomos descritos ou mapeados em nossos experimentos com a forma nativa da TMVcp, localizam-se próximos a uma fita beta e uma alfa hélice próxima. São compostos por aminoácidos hidrofóbicos e também por aminoácidos polares (FLSSAWADPIELINL, SAWADPIELINLCTN, ADPIELINLCTNALG) e a previsão de disponibilidade na superfície da proteína mostra apenas sete destes com alta probabilidade de exposição, entretanto, dada a posição entre duas estruturas secundárias, composição de aminoácidos e previsão de afinidades de ligação a MHC classe II para a estrutura linear nesta região sugere-se que o tratamento de alta pressão desestabilizou estas estruturas favorecendo a exposição e processamento destes epítomos.



Houve também maior intensidade de ligação na região 28 a 51 (CTNALGNQFQTQQAR, ALGNQFQTQQARTVV, NQFQTQQARTVVQRQ e QTQQARTVVQRQFSE) com anticorpos derivados da imunização pós pressão, pressão e baixa temperatura e pressão combinada com ureia 1 M. Na análise bioinformática, obteve-se *scores* maiores na análise de antigenicidade (Hopp-Woods) e também em hidrofobicidade (Kyte-Doolittle) para este fragmento. Estas regiões, entretanto, não correspondem em sua totalidade aos resultados de predição de exposição e área de superfície acessível, que preveem as regiões 21 a 37 e 57 a 60 como expostas. Por outro lado, em termos de clivagem por proteassomo, a região mencionada é alvo possível de clivagem que não era expostas antes do tratamento a 250 MPa. Nesta linha de raciocínio as afinidades por TAP e, em seguida, por MHC classe I para os resíduos nas posições 20-35 e 47-58 obtiveram os maiores *scores* para afinidade pós-clivagem ao transportador TAP e afinidades diferenciadas foram obtidas pelas ferramentas de predição para MHC, considerando os alelos dos H2-Kd, H2-Dd e H2-Ld de camundongos Balb/C, apenas para o alelo Ld que se observou maior afinidade na região mencionada. Já nas previsões para afinidade ao MHC de classe II, a região mencionada inicialmente (28 a 51) está completamente contida na previsão gerada para o alelo IAd, reforçando que dada à disponibilidade para processamento da região a geração de resposta adaptável ao fragmento é possível exatamente para o fragmento estudado – sendo as limitações mais prováveis para não apresentação na forma nativa da proteína das regiões iniciais a alteração de conformação e exposição de sítios para clivagem endossomal

favorecendo epítomos adjacentes, como as teorias propõem. Propõe-se que esta região sofreu alteração conformacional que permitiu processamento e apresentação, aumentando o reconhecimento verificado experimentalmente.

Uma região de ligação observada na forma nativa, no tratamento de alta pressão e baixa temperatura e também no tratamento com ureia não é observada no mapeamento gerado pelos anticorpos derivados apenas do tratamento sob pressão. Os resíduos 73 a 90 (RYNAVLDPLVTALLG, AVLDPLVTALLGAFD) estão inseridos entre duas folhas beta e o início de uma alfa hélice, estruturas que quando submetidas à pressão sofrem alterações de volume, que por sua vez podem ou expor áreas de clivagem imunológica ou ainda alterar a conformação da proteína neste ponto, dificultando a interação com os processos de apresentação antigênica. Os resultados de previsão de afinidades para este fragmento, por outro lado, indicam maior probabilidade de apresentação como epítomo. Com base nestas informações e também na literatura, que confirma a região como antigênica nestes pontos, sugere-se que o tratamento omitiu a apresentação deste epítomo por causar alterações na estrutura da TMVcp impossibilitando a interpretação imunológica observada no mapeamento nativo.

Em conclusão, os resultados relatados expandem o mapeamento de epítomos da TMVcp em modelos de camundongos além de incluir mapeamentos das formas alteradas sob pressão em contraste com algoritmos de previsão imunoinformática. Encontramos regiões discordantes das primeiramente consideradas como epítomos bem definidos que não ligaram anticorpos no

presente estudo, o que sugere uma exploração mais cuidadosa da maquinaria de processamento de antígenos diferentes nos modelos animais escolhidos à época. Utilizando algoritmos de previsão para a comparação dos resultados produzidos observamos concordância dos dados experimentais com estas previsões. Mapeamento de epítomos é uma ferramenta eficaz para medir e identificar quais as regiões de uma dada proteína ligam respostas por anticorpos e, quando utilizada em conjunto com as previsões *in silicio* fornecem um poderoso conjunto de instrumentos na decisão sobre as melhores opções de vacinas baseadas em epítomos. O tratamento da TMVcp nas condições de pressão, baixa temperatura e diferentes concentrações de uréia alterou nitidamente o perfil de apresentação e reconhecimento de antígenos, com resultados fundamentados na literatura e considerando as condições deste estudo. Estas informações são muito importantes principalmente nos casos onde as regiões imunogênicas determinantes para esta proteína foram conservadas após o tratamento juntamente com a revelação de novos epítomos até então ocultos pela estrutura da proteína. Estudos futuros podem avaliar, para os diferentes tipos de resposta imune, quais tratamentos serão mais adequados considerando variações de síntese de peptídeos. Exemplos destes tipos de estudo incluem ensaios com membranas cujos spots sintetizados mimetizam moléculas de MHC classe I e II interagindo com as formas tratadas e nativas e reveladas pelo mesmo mecanismo, ou ainda estudos com mais classes de imunoglobulinas seguindo o mesmo princípio deste trabalho, mas focando em imunodominância e reconhecimento decorrente das recombinações VDJ para as demais classes. Além disso, estudos

com base cristalográfica podem identificar corretamente quais alterações ocorreram efetivamente na estrutura da proteína, de modo que complementem os resultados aqui relatados para as formas tratadas, correlacionando-os com os passos de reconhecimento e processamento antigênico. Estudos de clivagem enzimática, mediada por enzimas da via endógena de degradação de proteínas em células apresentadoras de antígenos, realizados com as formas tratadas indicarão quais regiões foram expostas ou ocultas pelo tratamento com base no princípio de reconhecimento do sítio de clivagem fornecendo informações importantes sobre estrutura *versus* tratamento de alta pressão e, por consequência, melhorando estratégias de desenho vacinal.

A natureza complexa e variável das interações carboxilílicas nos tobamovirus fornece uma intrincada visão sobre a relação entre estrutura e função. Em particular, a natureza destas interações permite função e sobrevivência do vírus, para tanto, as características estruturais são chave, como, por exemplo, as interações das subunidades e a alta conservação de resíduos determinantes para montagem na sequência da proteína. Carboxilatos Caspar são claramente importantes na montagem e a desmontagem de todos os tobamoviruses já estudados. Definidos como as interações entre as cadeias laterais dos resíduos específicos, no entanto, as interações carboxi-carboxilato parecem permanecer mesmo quando alterações significativas na sequência de aminoácidos e estruturas derivadas são observadas. Esta capacidade de interações da estrutura da TMVcp para compensar efeitos mutacionais tem vantagens evolutivas determinantes para o vírus.

Dois grupos de aminoácidos ácidos são considerados importantes para as interações da estrutura helicoidal do TMV. Quando o vírus entra nas células, o pH mais elevado e os níveis mais baixos de cálcio aumentam a repulsão de carboxilatos vizinhos, desestabilizando o capsídeo. Este conceito foi originalmente proposto por Gaspar e posteriormente examinado por mutagênese sítio-dirigida (31, 375, 376). Foram identificados vários carboxilatos, incluindo Glu50 e ASP77, que estão em contato entre si na estrutura helicoidal, e um grupo de quatro aminoácidos ácidos, GLU95, GLU97, GLU106 e GLU109, voltados para a região interna da estrutura. Estas interações auxiliam na orientação de montagem bem como na estabilização dos capsômeros, como verificado em (377), no trabalho que inseriu mutações na TMVcp para este fim, confirmando que as cargas negativas destes aminoácidos são determinantes para desmontagem do capsídeo nas condições de replicação intracelular. Quando alterados, para verificação desta hipótese, os aminoácidos inseridos comprometeram a desmontagem do capsídeo e, portanto, a replicação viral. Como discutido anteriormente, os tratamentos de alta pressão são capazes de alterar significativamente a estrutura secundária de proteínas e por consequência influenciar a exposição de resíduos, formando novas possibilidades de interação (215). Juntamente com os relatos sobre os planos de interação possíveis para formação do capsídeo no TMV (87), informações sobre a dissociação em alta pressão (48) e o mapeamento sistemático dos epítopos lineares da TMVcp nativa (Lima Neto 2012 – *in press*), agora em combinação com o mapeamento das formas tratadas sugere alterações importantes neste processo.

Estudos de interação com outros vírus indicam que a montagem é facilitada pela subunidade interações específicas entre as subunidades de proteínas e uma sequência de RNA interno. No TMV, esta sequência de RNA permite a nucleação necessária para o alongamento adicional. Uma consequência disto é que a propriedade modificações na conformação do RNA e a ocorrência de mutações e modificações nas condições externas pode afetar o início da automontagem, bem como a velocidade de agregação dependente das interações proteína-RNA. Evidência experimental indica que, no caso do TMV, um grande número de interações ocorre para o alongamento rápido através da incorporação do disco de 20 S (38-42 subunidades da TMVcp) região 5'-terminal do RNA, na outra extremidade o processo é mais lento e.

Recentemente, Bispo e colaboradores descreveram aspectos termodinâmicos da dissociação do TMV por alta pressão hidrostática em diversas condições, incluindo temperaturas abaixo de zero e, na presença de ureia. Estes resultados indicaram que não houve desnaturação significativa quando a dissociação do capsídeo do vírus induzida por pressão ocorreu em baixas temperaturas e, na ausência de ureia. Dissociação significativa foi observada em concentrações sub-desnaturante de ureia (2,5 M). Desnaturação acentuada foi observada apenas em concentrações elevadas de ureia ou de concentrações sub-desnaturantes de ureia, em combinação com a pressão.

Do ponto de vista de interações dos capsômeros na automontagem dos capsídeos, considerando os tipos de epitopos na estrutura da TMVcp – definidos

por regenmortel – e também os resultados obtidos do mapeamento, observa-se o reconhecimento de regiões importantes envolvidas nestes processos, sugerindo exposição destas regiões diferenciais – não observadas no mapeamento da forma nativa – e, portanto, tornando-as acessíveis aos anticorpos do modelo testado. Observamos para as posições 49 a 78 (spots 16 a 21), porção da proteína em alfa hélice e voltas beta, localizada na porção RS, reconhecimento de anticorpos nos tratamentos de HHP, HHP / -18 °C e HHP / uréia 1 M (respectivamente, em termos de intensidade), sugerindo exposição desta região que, por sua vez, esta envolvida com interações com a subunidade TMVcp do plano superior da estrutura do capsídeo. A segunda região diferencial, contida entre os resíduos 70 a 96 (spots 24 a 28) responde pela região RR da proteína e com baixas probabilidades de exposição na superfície, de acordo com os dados de área de superfície acessível e com interações entre a subunidade adjacente abaixo no plano de automontagem também foi reconhecida nos tratamentos HHP / uréia 1 M, HHP e HHP / -18 °C (respectivamente, em termos de intensidade). A terceira região diferencial, observada nos mapeamentos esta relacionada à região dos resíduos 97 a 123 – região que contem os aminoácidos envolvidos nas interações dos Carboxilatos de Caspar, conhecida pelas interações laterais entre as subunidades, pela orientação interna em relação à estrutura helicoidal do capsídeo – foi reconhecida nos tratamentos mais extremos com HHP / -18 °C e uréia 4 M, com menor intensidade também no tratamento HHP apenas sugerindo acessibilidade às porções mais internas dos agregados bem como possíveis perturbações no processo de automontagem. Em resumo as regiões diferenciais observadas nos

mapeamentos relacionam-se com regiões de interações para estabilização do capsídeo, também susceptíveis às alterações de conformação induzidas por pressão por conta das estruturas secundárias, composição de aminoácidos e acessibilidade para processamento antigênico – decorrente dos tratamentos.

Neste trabalho, nós estendemos o estudo das partículas TMV investigando as modificações nas propriedades do vírus induzidas por alta pressão hidrostática em combinação com baixas temperaturas, condições desnaturantes de uréia e sub-desnaturantes do ponto de vista de reconhecimento de epitopos após imunizações com os vírus tratados. Estas observações proporcionam novas perspectivas para as mudanças estruturais que modificam as interações proteína-proteína e proteína-RNA.



## 7 Conclusões

- Existem diferenças entre os relatos da literatura e o mapeamento completo da TMVcp
- A estrutura 3D da TMVcp foi alterada significativamente e refletiu no reconhecimento nos diferentes tratamentos testados
- Os mecanismos de previsão de epítomos são baseados em bibliotecas geradas experimentalmente considerando estruturas nativas e não correspondem aos resultados dos tratamentos de pressão, temperatura e agentes desnaturantes.
- Condições desnaturantes podem contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de processamento antigênico no modelo animal estudado

## 8 Bibliografia

1. Matthews REF, Hull R. *Matthews' plant virology*. 4th ed. San Diego: Academic Press; 2002. xx, 1001 p. p.
2. Allard HA. The Mosaic Disease of Tobacco. *Science*. 1912;36(938):875-6. Epub 1912/12/20.
3. Brock TD. *Milestones in microbiology 1546 to 1940*. Washington, DC: ASM Press; 1999. xiv, 266 p. p.
4. Peitzman SJ. Felix d'Herelle and bacteriophage therapy. *Transactions & studies of the College of Physicians of Philadelphia*. 1969;37(2):115-23. Epub 1969/10/01.
5. Creager ANH. *The life of a virus : tobacco mosaic virus as an experimental model, 1930-1965*. Chicago: University of Chicago Press; 2002. xiv, 398 p. p.
6. Creager AN, Scholthof KB, Citovsky V, Scholthof HB. Tobacco mosaic virus. Pioneering research for a century. *The Plant cell*. 1999;11(3):301-8. Epub 1999/03/11.
7. Scholthof KB. Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annual review of phytopathology*. 2004;42:13-34. Epub 2004/07/31.
8. Scholthof K-BG, Shaw JG, Zaitlin M. *Tobacco mosaic virus : one hundred years of contributions to virology*. St. Paul, Minn.: APS Press; 1999. vii, 256 p. p.
9. Waterson AP, Wilkinson L. *An introduction to the history of virology*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 1978. xiv, 237 p., 1 leaf of plates p.
10. Evans AS. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *The Yale journal of biology and medicine*. 1976;49(2):175-95. Epub 1976/05/01.
11. Pennazio S, Conti M. The origin of modern plant virology. *The new microbiologica*. 2002;25(4):499-518. Epub 2002/11/20.
12. Scholthof KB. One foot in the furrow: linkages between agriculture, plant pathology, and public health. *Annual review of public health*. 2003;24:153-74. Epub 2002/12/10.
13. Pollock D. Forty years on: a war to recognise and win. How the tobacco industry has survived the revelations on smoking and health. *British medical bulletin*. 1996;52(1):174-82. Epub 1996/01/01.
14. Giovino GA. The tobacco epidemic in the United States. *American journal of preventive medicine*. 2007;33(6 Suppl):S318-26. Epub 2007/12/06.
15. Giovino GA. Epidemiology of tobacco use in the United States. *Oncogene*. 2002;21(48):7326-40. Epub 2002/10/16.

16. Pierce JP. Tobacco industry marketing, population-based tobacco control, and smoking behavior. *American journal of preventive medicine*. 2007;33(6 Suppl):S327-34. Epub 2007/12/06.
17. Emmons KM, Kawachi I, Barclay G. Tobacco control: a brief review of its history and prospects for the future. *Hematology/oncology clinics of North America*. 1997;11(2):177-95. Epub 1997/04/01.
18. Slade J. The tobacco epidemic: lessons from history. *Journal of psychoactive drugs*. 1989;21(3):281-91. Epub 1989/07/01.
19. Wipfli H, Samet JM. Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;86(3):263-71. Epub 2009/06/19.
20. Wipfli H, Samet JM. Global economic and health benefits of tobacco control: part 2. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;86(3):272-80. Epub 2009/06/19.
21. Max W, Tsoukalas T. Economics on trial: the use and abuse of economic methods in third party tobacco litigation. *Tobacco control*. 2006;15 Suppl 4:iv77-83. Epub 2006/11/30.
22. West R. Tobacco control: present and future. *British medical bulletin*. 2006;77-78:123-36. Epub 2006/11/16.
23. Kahende JW, Loomis BR, Adhikari B, Marshall L. A review of economic evaluations of tobacco control programs. *International journal of environmental research and public health*. 2009;6(1):51-68. Epub 2009/05/15.
24. Sussman S. Tobacco industry youth tobacco prevention programming: a review. *Prevention science : the official journal of the Society for Prevention Research*. 2002;3(1):57-67. Epub 2002/05/11.
25. Bartscherer DJ, Reichert VC, Folan P, DeGaetano C, Jacobsen DR, Miceli L, et al. Tobacco and the health care industry. *Clinics in occupational and environmental medicine*. 2006;5(1):55-71, viii. Epub 2006/02/01.
26. Carter SM. Tobacco document research reporting. *Tobacco control*. 2005;14(6):368-76. Epub 2005/12/02.
27. Heinlein M. The spread of tobacco mosaic virus infection: insights into the cellular mechanism of RNA transport. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59(1):58-82. Epub 2002/02/16.
28. Klug A. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1999;354(1383):531-5. Epub 1999/04/23.
29. Makowski L. Don Caspar, TMV, and protein-protein interactions. *Proteins*. 1998;30(2):109-12. Epub 1998/03/07.
30. Van Regenmortel MH, Altschuh D, Zeder-Lutz G. Tobacco mosaic virus: a model antigen to study virus-antibody interactions. *Biochimie*. 1993;75(8):731-9. Epub 1993/01/01.

31. Caspar DL, Namba K. Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus. *Adv Biophys.* 1990;26:157-85. Epub 1990/01/01.
32. Okada Y. Molecular assembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Adv Biophys.* 1986;22:95-149. Epub 1986/01/01.
33. Dada JO, Mendes P. Multi-scale modelling and simulation in systems biology. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro.* 2011;3(2):86-96. Epub 2011/01/08.
34. Geris L, Vander Sloten J, Van Oosterwyck H. In silico biology of bone modelling and remodelling: regeneration. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences.* 2009;367(1895):2031-53. Epub 2009/04/22.
35. Tomlin CJ, Axelrod JD. Biology by numbers: mathematical modelling in developmental biology. *Nature reviews Genetics.* 2007;8(5):331-40. Epub 2007/04/19.
36. Aloy P, Russell RB. Structural systems biology: modelling protein interactions. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2006;7(3):188-97. Epub 2006/02/24.
37. Bendahmane M, Chen I, Asurmendi S, Bazzini AA, Szecsi J, Beachy RN. Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein. *Virology.* 2007;366(1):107-16. Epub 2007/05/15.
38. Erickson FL, Dinesh-Kumar SP, Holzberg S, Ustach CV, Dutton M, Handley V, et al. Interactions between tobacco mosaic virus and the tobacco N gene. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 1999;354(1383):653-8. Epub 1999/04/23.
39. Nejdat A, Beachy RN. Decreased levels of TMV coat protein in transgenic tobacco plants at elevated temperatures reduce resistance to TMV infection. *Virology.* 1989;173(2):531-8. Epub 1989/12/01.
40. Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science.* 1986;232(4751):738-43. Epub 1986/05/09.
41. Siddiqui SA, Sarmiento C, Valkonen S, Truve E, Lehto K. Suppression of infectious TMV genomes expressed in young transgenic tobacco plants. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI.* 2007;20(12):1489-94. Epub 2007/11/10.
42. Lewis RS, Linger LR, Wolff MF, Wernsman EA. The negative influence of N-mediated TMV resistance on yield in tobacco: linkage drag versus pleiotropy. *Theor Appl Genet.* 2007;115(2):169-78. Epub 2007/05/12.
43. Li M, Li P, Song R, Xu Z. An induced hypersensitive-like response limits expression of foreign peptides via a recombinant TMV-based vector in a susceptible tobacco. *PLoS one.* 2010;5(11):e15087. Epub 2010/12/03.
44. Smith ML, Fitzmaurice WP, Turpen TH, Palmer KE. Display of peptides on the surface of tobacco mosaic virus particles. *Current topics in microbiology and immunology.* 2009;332:13-31. Epub 2009/04/30.

45. McCormick AA, Palmer KE. Genetically engineered Tobacco mosaic virus as nanoparticle vaccines. *Expert review of vaccines*. 2008;7(1):33-41. Epub 2008/02/07.
46. Saejung W, Fujiyama K, Takasaki T, Ito M, Hori K, Malasit P, et al. Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. *Vaccine*. 2007;25(36):6646-54. Epub 2007/07/31.
47. Ouko MO, Sambade A, Brandner K, Niehl A, Pena E, Ahad A, et al. Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2010;62(5):829-39. Epub 2010/03/17.
48. Santos JL, Bispo JA, Landini GF, Bonafe CF. Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure. *Biophysical chemistry*. 2004;111(1):53-61. Epub 2004/09/29.
49. Karpova O, Nikitin N, Chirkov S, Trifonova E, Sheveleva A, Lazareva E, et al. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *The Journal of general virology*. 2012;93(Pt 2):400-7. Epub 2011/11/04.
50. Karpova O, Nikitin N, Chirkov S, Trifonova E, Sheveleva A, Lazareva E, et al. Immunogenic compositions assembled from TMV-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *The Journal of general virology*. 2011. Epub 2011/11/04.
51. Shaw JG. Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1999;354(1383):603-11. Epub 1999/04/23.
52. Stubbs G. Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1999;354(1383):551-7. Epub 1999/04/23.
53. Holmes KC. Protein-RNA interactions during TMV assembly. *J Supramol Struct*. 1979;12(3):305-20. Epub 1979/01/01.
54. Okada Y. Mechanism of assembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Adv Biophys*. 1975;7:1-41. Epub 1975/01/01.
55. Brishammar S. Separation studies of TMV replicase. *Ann Microbiol (Paris)*. 1976;127A(1):25-31. Epub 1976/01/01.
56. Brishammar S, Juntti N. Partial purification and characterization of soluble TMV replicase. *Virology*. 1974;59(1):245-53. Epub 1974/05/01.
57. Fraser RS. Extraction and assay of TMV RNA. *Virology*. 1971;45(3):804-7. Epub 1971/09/01.
58. Ono T, Nozu Y, Okada Y. Polar reconstitution of tobacco mosaic virus (TMV). *Virology*. 1971;44(3):510-6. Epub 1971/06/01.
59. Rybicki EP. RNA Plant and Animal Virus Replication. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2003.

60. Kaun KR, Devineni AV, Heberlein U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. *Human genetics*. 2012;131(6):959-75. Epub 2012/02/22.
61. Hughes TT, Allen AL, Bardin JE, Christian MN, Daimon K, Dozier KD, et al. *Drosophila* as a genetic model for studying pathogenic human viruses. *Virology*. 2012;423(1):1-5. Epub 2011/12/20.
62. Lundegaard C. Mice, men and MHC supertypes. *Expert review of vaccines*. 2010;9(7):713-8. Epub 2010/07/14.
63. Weizsäcker Fv, Roggendorf M. *Models of viral hepatitis*. Basel ; New York: Karger; 2005. viii, 164 p. p.
64. Marsh EK, May RC. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(7):2075-81. Epub 2012/01/31.
65. Buck KW. Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1999;354(1383):613-27. Epub 1999/04/23.
66. Gallie DR. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic acids research*. 2002;30(15):3401-11. Epub 2002/07/26.
67. Jiang L, Li Q, Li M, Zhou Z, Wu L, Fan J, et al. A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco. *Vaccine*. 2006;24(2):109-15. Epub 2005/12/13.
68. Rabindran S, Dawson WO. Assessment of recombinants that arise from the use of a TMV-based transient expression vector. *Virology*. 2001;284(2):182-9. Epub 2001/06/01.
69. Kiraly Z, Barna B, Kecskes A, Fodor J. Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Radic Res*. 2002;36(9):981-91. Epub 2002/11/27.
70. Beachy RN. Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1999;354(1383):659-64. Epub 1999/04/23.
71. Borovsky D, Rabindran S, Dawson WO, Powell CA, Iannotti DA, Morris TJ, et al. Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(50):18963-8. Epub 2006/12/07.
72. Man M, Epel BL. Assessment of the effectiveness of a nuclear-launched TMV-based replicon as a tool for foreign gene expression in plants in comparison to direct gene expression from a nuclear promoter. *Transgenic Res*. 2006;15(1):107-13. Epub 2006/02/14.
73. Shivprasad S, Pogue GP, Lewandowski DJ, Hidalgo J, Donson J, Grill LK, et al. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology*. 1999;255(2):312-23. Epub 1999/03/10.

74. Jockusch H, Wiegand C. Misfolded plant virus proteins: elicitors and targets of ubiquitylation. *FEBS letters*. 2003;545(2-3):229-32. Epub 2003/06/14.
75. Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*. 2003;302(5646):819-22. Epub 2003/11/01.
76. Citovsky V. Tobacco mosaic virus: a pioneer of cell-to-cell movement. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1999;354(1383):637-43. Epub 1999/04/23.
77. Citovsky V, Wong ML, Shaw AL, Prasad BV, Zambryski P. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *The Plant cell*. 1992;4(4):397-411. Epub 1992/04/01.
78. Citovsky V, Zaltsman A, Kozlovsky SV, Gafni Y, Krichevsky A. Proteasomal degradation in plant-pathogen interactions. *Seminars in cell & developmental biology*. 2009;20(9):1048-54. Epub 2009/06/10.
79. Citovsky V, McLean BG, Zupan JR, Zambryski P. Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes & development*. 1993;7(5):904-10. Epub 1993/05/01.
80. Giesman-Cookmeyer D, Silver S, Vaewhongs AA, Lommel SA, Deom CM. Tobamovirus and dianthovirus movement proteins are functionally homologous. *Virology*. 1995;213(1):38-45. Epub 1995/10/20.
81. Guenoune-Gelbart D, Elbaum M, Sagi G, Levy A, Epel BL. Tobacco mosaic virus (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 2008;21(3):335-45. Epub 2008/02/09.
82. Mas P, Beachy RN. Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *The Journal of cell biology*. 1999;147(5):945-58. Epub 1999/12/01.
83. Taoka K, Ham BK, Xoconostle-Cazares B, Rojas MR, Lucas WJ. Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *The Plant cell*. 2007;19(6):1866-84. Epub 2007/07/03.
84. Liu Y, Burch-Smith T, Schiff M, Feng S, Dinesh-Kumar SP. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(3):2101-8. Epub 2003/10/30.
85. Watanabe Y, Morita N, Nishiguchi M, Okada Y. Attenuated strains of tobacco mosaic virus. Reduced synthesis of a viral protein with a cell-to-cell movement function. *Journal of molecular biology*. 1987;194(4):699-704. Epub 1987/04/20.
86. Kubota K, Tsuda S, Tamai A, Meshi T. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *Journal of virology*. 2003;77(20):11016-26. Epub 2003/09/27.

87. Van Regenmortel MH. The antigenicity of tobacco mosaic virus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1999;354(1383):559-68. Epub 1999/04/23.
88. Benjamini E, Leung CY, Rennick DM. Immunochemical studies on the tobacco mosaic virus protein. *Advances in experimental medicine and biology*. 1978;98:165-79. Epub 1978/01/01.
89. Rappaport I. The antigenic structure of tobacco mosaic virus. *Advances in virus research*. 1965;11:223-75. Epub 1965/01/01.
90. Anderer FA. Recent Studies on the Structure of Tobacco Mosaic Virus. *Adv Protein Chem*. 1963;18:1-35. Epub 1963/01/01.
91. Anderer FA, Strobel G. Recognition of conjugated and native peptide determinants. II. Enhancement of antibodies with sequential specificity in anti-TMV sera by preimmunization with conjugated peptide antigens. *European journal of immunology*. 1972;2(3):278-82. Epub 1972/06/01.
92. Arnon R. Chemically defined antiviral vaccines. *Annual review of microbiology*. 1980;34:593-618. Epub 1980/01/01.
93. Bloomer AC, Champness JN, Bricogne G, Staden R, Klug A. Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 Å resolution showing the interactions within and between subunits. *Nature*. 1978;276(5686):362-8. Epub 1978/11/23.
94. Champness JN, Bloomer AC, Bricogne G, Butler PG, Klug A. The structure of the protein disk of tobacco mosaic virus to 5Å resolution. *Nature*. 1976;259(5538):20-4. Epub 1976/01/01.
95. Jeener R. Influence of thiouracil incorporation in the ribonucleic acid moiety of tobacco mosaic virus on its multiplication. *Biochimica et biophysica acta*. 1954;13(1):148-9. Epub 1954/01/01.
96. Takahashi WN, Ishii M. An abnormal protein associated with tobacco mosaic virus infection. *Nature*. 1952;169(4297):419-20. Epub 1952/03/08.
97. Aach HG. [Serological studies on the structure of tobacco mosaic virus]. *Biochimica et biophysica acta*. 1959;32(1):140-6. Epub 1959/03/01. Serologische Untersuchungen zur Struktur des Tabakmosaikvirus.
98. Van Regenmortel MH, Altschuh D, Klug A. Influence of local structure on the location of antigenic determinants in tobacco mosaic virus protein. *Ciba Foundation symposium*. 1986;119:76-92. Epub 1986/01/01.
99. Jerne NK. Immunological speculations. *Annual review of microbiology*. 1960;14:341-58. Epub 1960/01/01.
100. Dekker EL, Dore I, Porta C, van Regenmortel MH. Conformational specificity of monoclonal antibodies used in the diagnosis of tomato mosaic virus. *Archives of virology*. 1987;94(3-4):191-203. Epub 1987/01/01.



101. Briand JP, Al Moudallal Z, Van Regenmortel MH. Serological differentiation of tobamoviruses by means of monoclonal antibodies. *Journal of virological methods*. 1982;5(5-6):293-300. Epub 1982/12/01.
102. Dore I, Altschuh D, Al Moudallal Z, Van Regenmortel MH. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--VII. Use of comparative surface accessibility of residues in antigenically related viruses for delineating epitopes recognized by monoclonal antibodies. *Molecular immunology*. 1987;24(12):1351-8. Epub 1987/12/01.
103. Al Moudallal Z, Briand JP, Van Regenmortel MH. Monoclonal antibodies as probes of the antigenic structure of tobacco mosaic virus. *The EMBO journal*. 1982;1(8):1005-10. Epub 1982/01/01.
104. Al Moudallal Z, Altschuh D, Briand JP, Van Regenmortel MH. Comparative sensitivity of different ELISA methods for detecting monoclonal antibodies to viruses. *Developments in biological standardization*. 1984;57:35-40. Epub 1984/01/01.
105. Saunal H, Witz J, Van Regenmortel MH. Inhibition of in vitro cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus by monoclonal antibodies to the viral coat protein. *The Journal of general virology*. 1993;74 ( Pt 5):897-900. Epub 1993/05/01.
106. Dimmock NJ. Neutralization of animal viruses. *Current topics in microbiology and immunology*. 1993;183:1-149. Epub 1993/01/01.
107. Van Regenmortel MH, Hardie G. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--II. Univalent and monogamous bivalent binding of IgG antibody. *Immunochemistry*. 1976;13(6):503-7. Epub 1976/06/01.
108. Mamet-Bratley MD. Evidence concerning homogeneity of the combining sites of purified antibody. *Immunochemistry*. 1966;3(3):155-62. Epub 1966/05/01.
109. Hardie G, van Regenmortel MH. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--I: refutation of the alleged homogeneous binding of purified antibody fragments. *Immunochemistry*. 1975;12(11):903-8. Epub 1975/11/01.
110. Opie EL, Freund J. An Experimental Study of Protective Inoculation with Heat Killed Tubercle Bacilli. *The Journal of experimental medicine*. 1937;66(6):761-88. Epub 1937/11/30.
111. Tan L, Weissig V, Gregoriadis G. Comparison of the immune response against polio peptides covalently-surface-linked to and internally-entrapped in liposomes. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand*. 1991;9(1):25-30. Epub 1991/06/01.
112. Ada GL. What to expect of a good vaccine and how to achieve it. *Vaccine*. 1988;6(2):77-9. Epub 1988/04/01.
113. Goebel WF. Studies on Antibacterial Immunity Induced by Artificial Antigens : I. Immunity to Experimental Pneumococcal Infection with an Antigen Containing Cellobiuronic Acid. *The Journal of experimental medicine*. 1939;69(3):353-64. Epub 1939/02/28.

114. Cohen H, Nagel J. Two injections of diphtheria-tetanus-pertussis-polio vaccine as the backbone of a simplified immunization schedule in developing countries. *Reviews of infectious diseases*. 1984;6 Suppl 2:S350-1. Epub 1984/05/01.
115. Heber-Katz E, Dietzschold B. Immune response to synthetic herpes simplex virus peptides: the feasibility of a synthetic vaccine. *Current topics in microbiology and immunology*. 1986;130:51-64. Epub 1986/01/01.
116. Deres K, Schild H, Wiesmuller KH, Jung G, Rammensee HG. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature*. 1989;342(6249):561-4. Epub 1989/11/30.
117. Horsfall AC, Hay FC, Soltys AJ, Jones MG. Epitope mapping. *Immunology today*. 1991;12(7):211-3. Epub 1991/07/01.
118. Banting GS, Pym B, Darling SM, Goodfellow PN. The MIC2 gene product: epitope mapping and structural prediction analysis define an integral membrane protein. *Molecular immunology*. 1989;26(2):181-8. Epub 1989/02/01.
119. Ikegaki N, Kennett RH. Molecular genetic characterization of epitope-specific monoclonal antibodies against the myc family proteins. *Oncogene*. 1990;5(3):397-403. Epub 1990/03/01.
120. Ackermans F, Pini A, Wachsmann D, Scholler M, Ogier J, Klein JP. Anti-IgG antibodies in rheumatic diseases cross-react with *Streptococcus mutans* SR antigen. *Clinical and experimental immunology*. 1991;85(2):265-9. Epub 1991/08/01.
121. Wang XB, Milne R, Marcel Y, Rassart E. A vector that expresses secreted proteins on the cell surface. *DNA*. 1989;8(10):753-8. Epub 1989/12/01.
122. Virji M, Weiser JN, Lindberg AA, Moxon ER. Antigenic similarities in lipopolysaccharides of *Haemophilus* and *Neisseria* and expression of a digalactoside structure also present on human cells. *Microbial pathogenesis*. 1990;9(6):441-50. Epub 1990/12/01.
123. Bahouth SW, Wang HY, Malbon CC. Immunological approaches for probing receptor structure and function. *Trends in pharmacological sciences*. 1991;12(9):338-43. Epub 1991/09/01.
124. Bahouth SW. Thyroid hormones transcriptionally regulate the beta 1-adrenergic receptor gene in cultured ventricular myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(24):15863-9. Epub 1991/08/25.
125. Parry NR, Barnett PV, Ouldrige EJ, Rowlands DJ, Brown F. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents. *The Journal of general virology*. 1989;70 ( Pt 6):1493-503. Epub 1989/06/01.
126. Grouzmann E, Comoy E, Bohuon C. Plasma neuropeptide Y concentrations in patients with neuroendocrine tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1989;68(4):808-13. Epub 1989/04/01.

127. Kotwal GJ, Baroudy BM, Kuramoto IK, McDonald FF, Schiff GM, Holland PV, et al. Detection of acute hepatitis C virus infection by ELISA using a synthetic peptide comprising a structural epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(10):4486-9. Epub 1992/05/15.
128. Dillner J. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1990;46(4):703-11. Epub 1990/10/15.
129. Dillner J, Dillner L, Utter G, Eklund C, Rotola A, Costa S, et al. Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1990;45(3):529-35. Epub 1990/03/15.
130. Doel TR, Doel CM, Staple RF, DiMarchi R. Cross-reactive and serotype-specific antibodies against foot-and-mouth disease virus generated by different regions of the same synthetic peptide. *Journal of virology*. 1992;66(4):2187-94. Epub 1992/04/01.
131. Barlow DJ, Thornton JM. The distribution of charged groups in proteins. *Biopolymers*. 1986;25(9):1717-33. Epub 1986/09/01.
132. Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*. 1986;322(6081):747-8. Epub 1986/08/21.
133. Burnens A, Demotz S, Corradin G, Binz H, Bosshard HR. Epitope mapping by chemical modification of free and antibody-bound protein antigen. *Science*. 1987;235(4790):780-3. Epub 1987/02/13.
134. Jemmerson R, Paterson Y. Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen-antibody complexes. *Science*. 1986;232(4753):1001-4. Epub 1986/05/23.
135. Suckau D, Kohl J, Karwath G, Schneider K, Casaretto M, Bitter-Suermann D, et al. Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(24):9848-52. Epub 1990/12/01.
136. Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *Journal of immunological methods*. 2002;267(1):13-26. Epub 2002/07/24.
137. Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol*. 1996;66:149-69. Epub 1996/01/01.
138. Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, et al. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;418(1):38-43. Epub 2012/01/10.

139. Sun M, Yu D, Mo H, Cao H, Chen C, Chen F. Epitope Mapping of a Monoclonal Antibody against the gp85 of Avian Leukosis Virus Subgroup J. *J Vet Med Sci*. 2011. Epub 2012/01/05.
140. Cai K, Feng JN, Wang Q, Li T, Shi J, Hou XJ, et al. Fine mapping and interaction analysis of a linear rabies virus neutralizing epitope. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2010;12(12-13):948-55. Epub 2010/07/06.
141. Cretich M, Longhi R, Corti A, Damin F, Di Carlo G, Sedini V, et al. Epitope mapping of human chromogranin A by peptide microarrays. *Methods Mol Biol*. 2009;570:221-32. Epub 2009/08/04.
142. Frieder M, Lewinsohn DM. T-cell epitope mapping in *Mycobacterium tuberculosis* using pepmixes created by micro-scale SPOT- synthesis. *Methods Mol Biol*. 2009;524:369-82. Epub 2009/04/21.
143. Moret MA, Zebende GF. Amino acid hydrophobicity and accessible surface area. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 2007;75(1 Pt 1):011920. Epub 2007/03/16.
144. Zvelebil MJ, Tang L, Cookson E, Selkirk ME, Thornton JM. Molecular modelling and epitope prediction of gp29 from lymphatic filariae. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;58(1):145-53. Epub 1993/03/01.
145. Richmond TJ. Solvent accessible surface area and excluded volume in proteins. Analytical equations for overlapping spheres and implications for the hydrophobic effect. *Journal of molecular biology*. 1984;178(1):63-89. Epub 1984/09/05.
146. Karplus PA, Schulz, G.E. . Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens. *Naturwissenschaften* 1985;72:2.
147. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*. 1982;157(1):105-32. Epub 1982/05/05.
148. Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(6):3824-8. Epub 1981/06/01.
149. Welling GW, Weijer WJ, van der Zee R, Welling-Wester S. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS letters*. 1985;188(2):215-8. Epub 1985/09/02.
150. Chou PY, Fasman GD. Empirical predictions of protein conformation. *Annual review of biochemistry*. 1978;47:251-76. Epub 1978/01/01.
151. Parker PJ, Goris J, Merlevede W. Specificity of protein phosphatases in the dephosphorylation of protein kinase C. *The Biochemical journal*. 1986;240(1):63-7. Epub 1986/11/15.
152. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 1986;25(19):5425-32. Epub 1986/09/23.

153. Qian N, Sejnowski TJ. Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models. *Journal of molecular biology*. 1988;202(4):865-84. Epub 1988/08/20.
154. Kabsch W, Sander C. How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS letters*. 1983;155(2):179-82. Epub 1983/05/08.
155. Levin JM, Garnier J. Improvements in a secondary structure prediction method based on a search for local sequence homologies and its use as a model building tool. *Biochimica et biophysica acta*. 1988;955(3):283-95. Epub 1988/08/10.
156. Wolf H, Modrow S, Motz M, Jameson BA, Hermann G, Fortsch B. An integrated family of amino acid sequence analysis programs. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*. 1988;4(1):187-91. Epub 1988/03/01.
157. Benner SA. Patterns of divergence in homologous proteins as indicators of tertiary and quaternary structure. *Advances in enzyme regulation*. 1989;28:219-36. Epub 1989/01/01.
158. Fasman GD, Gilbert WA. The prediction of transmembrane protein sequences and their conformation: an evaluation. *Trends in biochemical sciences*. 1990;15(3):89-92. Epub 1990/03/01.
159. Bessler WG, Suhr B, Buhning HJ, Muller CP, Wiesmuller KH, Becker G, et al. Specific antibodies elicited by antigen covalently linked to a synthetic adjuvant. *Immunobiology*. 1985;170(3):239-44. Epub 1985/09/01.
160. Beattie J. Identification of antibodies to bovine growth hormone binding to defined, continuous epitopes within the protein. *Biochemical Society transactions*. 1992;20(4):843-7. Epub 1992/11/01.
161. Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, Wolf H. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *Journal of virology*. 1987;61(2):570-8. Epub 1987/02/01.
162. Middeldorp JM, Meloen RH. Epitope-mapping on the Epstein-Barr virus major capsid protein using systematic synthesis of overlapping oligopeptides. *Journal of virological methods*. 1988;21(1-4):147-59. Epub 1988/09/01.
163. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(12):823-36. Epub 2011/11/15.
164. Townsend AR, Gotch FM, Davey J. Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. *Cell*. 1985;42(2):457-67. Epub 1985/09/01.
165. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987;329(6139):506-12. Epub 1987/10/08.

166. Falk K, Rotzschke O, Rammensee HG. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 1990;348(6298):248-51. Epub 1990/11/15.
167. Rotzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, et al. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*. 1990;348(6298):252-4. Epub 1990/11/15.
168. Rotzschke O, Falk K, Wallny HJ, Faath S, Rammensee HG. Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. *Science*. 1990;249(4966):283-7. Epub 1990/07/20.
169. Walker CM. How do CD8+ T lymphocytes control HIV replication in vivo? *Research in immunology*. 1989;140(1):115-8; discussion 22-3. Epub 1989/01/01.
170. Gotch F, McMichael A, Rothbard J. Recognition of influenza A matrix protein by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes. Use of analogues to orientate the matrix peptide in the HLA-A2 binding site. *The Journal of experimental medicine*. 1988;168(6):2045-57. Epub 1988/12/01.
171. Falk K, Rotzschke O, Deres K, Metzger J, Jung G, Rammensee HG. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(2):425-34. Epub 1991/08/01.
172. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991;351(6324):290-6. Epub 1991/05/23.
173. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*. 1988;332(6167):845-50. Epub 1988/04/28.
174. Bogen B, Lambris JD. Minimum length of an idiotypic peptide and a model for its binding to a major histocompatibility complex class II molecule. *The EMBO journal*. 1989;8(7):1947-52. Epub 1989/07/01.
175. Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG. Exact prediction of a natural T cell epitope. *European journal of immunology*. 1991;21(11):2891-4. Epub 1991/11/01.
176. Gammon G, Geysen HM, Apple RJ, Pickett E, Palmer M, Ametani A, et al. T cell determinant structure: cores and determinant envelopes in three mouse major histocompatibility complex haplotypes. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(3):609-17. Epub 1991/03/01.
177. Callebaut I, Burny A, Krchnak V, Gras-Masse H, Wathelet B, Portetelle D. Use of synthetic peptides to map sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein. *Virology*. 1991;185(1):48-55. Epub 1991/11/01.

178. Callebaut M. Light- and electron-microscopic observations on the relationship between prelampbrush oocytes and surrounding granulosa cells in the laying Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction, nutrition, development*. 1991;31(4):461-71. Epub 1991/01/01.
179. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(15):5131-5. Epub 1985/08/01.
180. Beck-Sickinger AG, Durr H, Jung G. Semiautomated T-bag peptide synthesis using 9-fluorenyl-methoxycarbonyl strategy and benzotriazol-1-yl-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate activation. *Peptide research*. 1991;4(2):88-94. Epub 1991/03/01.
181. Muller M, Gausepohl H, de Martynoff G, Frank R, Brasseur R, Gissmann L. Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 protein E4, E6, E7 and L1. *The Journal of general virology*. 1990;71 ( Pt 11):2709-17. Epub 1990/11/01.
182. Nokihara K, Morita N, Kuriki T. Applications of an automated apparatus for two-dimensional electrophoresis, Model TEP-1, for microsequence analyses of proteins. *Electrophoresis*. 1992;13(9-10):701-7. Epub 1992/09/01.
183. Han T, Sui J, Bennett AS, Liddington RC, Donis RO, Zhu Q, et al. Fine epitope mapping of monoclonal antibodies against hemagglutinin of a highly pathogenic H5N1 influenza virus using yeast surface display. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;409(2):253-9. Epub 2011/05/17.
184. Hatta M, Asano Y, Masunaga K, Ito T, Okazaki K, Toyoda T, et al. Epitope mapping of the influenza A virus RNA polymerase PA using monoclonal antibodies. *Archives of virology*. 2000;145(5):895-903. Epub 2000/07/06.
185. Hilpert K, Winkler DF, Hancock RE. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature protocols*. 2007;2(6):1333-49. Epub 2007/06/05.
186. Geysen HM. Molecular technology: peptide epitope mapping and the pin technology. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990;21(4):523-33. Epub 1990/12/01.
187. Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(13):3998-4002. Epub 1984/07/01.
188. Resing KA, Walsh KA, Haugen-Scofield J, Dale BA. Identification of proteolytic cleavage sites in the conversion of profilaggrin to filaggrin in mammalian epidermis. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(3):1837-45. Epub 1989/01/25.
189. Maeji NJ, Bray AM, Geysen HM. Multi-pin peptide synthesis strategy for T cell determinant analysis. *Journal of immunological methods*. 1990;134(1):23-33. Epub 1990/11/06.

190. Chamoiseau G, Chassot P, Leclercq M. [Nutritional prophylaxis of hypovitaminosis in Mauritania. Cattle rearing and beta-carotene]. *Revue internationale du trachome et de pathologie oculaire tropicale et subtropicale et de sante publique : organe de la Ligue contre le trachome avec la collaboration de l'International Organization*. 1992;69:167-75. Epub 1992/01/01. Prophylaxie nutritionnelle de l'hypovitaminose a en Mauritanie. *Elevage et beta-carotene*.
191. Ichiyama K, Ishikawa D, Tanaka Y, Kashiwa T, Koyanagi Y, Handa S, et al. Epitope mapping of rat neutralizing monoclonal antibody against human immunodeficiency virus type-1 by a phage peptide library: comparison with ELISA using synthetic peptides. *Viral Immunol*. 1999;12(1):57-66. Epub 1999/05/20.
192. Otake K, Fujii Y, Tashiro M, Adachi A, Kitoh J. Epitope mapping of murine monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus type 1 Nef. *Exp Anim*. 1997;46(1):53-8. Epub 1997/01/01.
193. Kusk P, Lindhardt BO, Bugge TH, Holmback K, Hulgaard EF. Mapping of a new immunodominant human linear B-cell epitope on the vpu protein of the human immunodeficiency virus type 1. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 1993;6(4):334-8. Epub 1993/04/01.
194. Xu JY, Gorny MK, Palker T, Karwowska S, Zolla-Pazner S. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. *Journal of virology*. 1991;65(9):4832-8. Epub 1991/09/01.
195. Neurath AR, Strick N, Lee ES. B cell epitope mapping of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins with long (19- to 36-residue) synthetic peptides. *The Journal of general virology*. 1990;71 ( Pt 1):85-95. Epub 1990/01/01.
196. Pasquali JL, Kieny MP, Kolbe H, Christmann D, Knapp AM. Immunogenicity and epitope mapping of a recombinant soluble gp160 of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *AIDS research and human retroviruses*. 1990;6(9):1107-13. Epub 1990/09/01.
197. Chandra P, Gerber T, Chandra A, Sarin PS, Pavlikov SP, Sidorovich I, et al. Epitope mapping of the low-molecular-mass subunits of reverse transcriptase in human immunodeficiency virus type 1 by monoclonal antibodies. *Biomed Sci*. 1990;1(5):507-12. Epub 1990/01/01.
198. Trifilieff E, Dubs MC, Van Regenmortel MH. Antigenic cross-reactivity potential of synthetic peptides immobilized on polyethylene rods. *Molecular immunology*. 1991;28(8):889-96. Epub 1991/08/01.
199. Weber G, Drickamer HG. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Quarterly reviews of biophysics*. 1983;16(1):89-112. Epub 1983/02/01.
200. Heremans K, De Smedt H, Wuytack F. Pressure effects on protein-lipid interactions. *Biophysical journal*. 1982;37(1):74-5. Epub 1982/01/01.
201. Heremans K. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annu Rev Biophys Bioeng*. 1982;11:1-21. Epub 1982/01/01.



202. Gaspar LP, Mendes YS, Yamamura AM, Almeida LF, Caride E, Goncalves RB, et al. Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: implications for vaccine development. *Journal of virological methods*. 2008;150(1-2):57-62. Epub 2008/04/19.
203. Lottersberger J, Guerrero SA, Tonarelli GG, Frank R, Tarabla H, Vanasco NB. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Letters in applied microbiology*. 2009;49(5):641-5. Epub 2009/09/29.
204. Nakagami T, Ohno H, Shigehisa T, Otake T, Mori H, Kawahata T, et al. Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure. *Transfusion*. 1996;36(5):475-6. Epub 1996/05/01.
205. Nakagami T, Shigehisa T, Ohmori T, Taji S, Hase A, Kimura T, et al. Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *Journal of virological methods*. 1992;38(2):255-61. Epub 1992/08/01.
206. Kingsley DH, Guan D, Hoover DG, Chen H. Inactivation of hepatitis A virus by high-pressure processing: the role of temperature and pressure oscillation. *Journal of food protection*. 2006;69(10):2454-9. Epub 2006/10/28.
207. Ishimaru D, Sa-Carvalho D, Silva JL. Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine*. 2004;22(17-18):2334-9. Epub 2004/05/20.
208. Bonafe CF, Vital CM, Telles RC, Goncalves MC, Matsuura MS, Pessine FB, et al. Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochemistry*. 1998;37(31):11097-105. Epub 1998/08/07.
209. Bispo JA, Santos JL, Landini GF, Goncalves JM, Bonafe CF. pH dependence of the dissociation of multimeric hemoglobin probed by high hydrostatic pressure. *Biophysical chemistry*. 2007;125(2-3):341-9. Epub 2006/10/19.
210. Santos JL, Aparicio R, Joekes I, Silva JL, Bispo JA, Bonafe CF. Different urea stoichiometries between the dissociation and denaturation of tobacco mosaic virus as probed by hydrostatic pressure. *Biophysical chemistry*. 2008;134(3):214-24. Epub 2008/03/28.
211. Silva JL, Weber G. Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J Mol Biol*. 1988;199(1):149-59. Epub 1988/01/05.
212. Pontes L, Cordeiro Y, Giongo V, Villas-Boas M, Barreto A, Araujo JR, et al. Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein Vp4. *J Mol Biol*. 2001;307(5):1171-9. Epub 2001/04/09.
213. Mota-Miranda AC, de-Oliveira T, Moreau DR, Bomfim C, Galvao-Castro B, Alcantara LC, Jr. Mapping the molecular characteristics of Brazilian human T-cell lymphotropic virus type 1 Env (gp46) and Pol amino acid sequences for vaccine design. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(6):741-9. Epub 2007/10/10.
214. Gaspar LP, Silva AC, Gomes AM, Freitas MS, Ano Bom AP, Schwarcz WD, et al. Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(10):8433-9. Epub 2001/11/28.

215. Heremans K, Smeller L. Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1386(2):353-70. Epub 1998/09/12.
216. Gomes AM, Pinheiro AS, Bonafe CF, Silva JL. Pressure-induced fusogenic conformation of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Biochemistry*. 2003;42(18):5540-6. Epub 2003/05/07.
217. Bonafe CF, Araujo JR, Silva JL. Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry*. 1994;33(9):2651-60. Epub 1994/03/08.
218. Kniel KE, Shearer AE, Cascarino JL, Wilkins GC, Jenkins MC. High hydrostatic pressure and UV light treatment of produce contaminated with *Eimeria acervulina* as a *Cyclospora cayentanensis* surrogate. *Journal of food protection*. 2007;70(12):2837-42. Epub 2007/12/22.
219. Silva JL, Villas-Boas M, Bonafe CF, Meirelles NC. Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(27):15863-8. Epub 1989/09/25.
220. Bonafe CF, Villas-Boas M, Suarez MC, Silva JL. Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(20):13210-6. Epub 1991/07/15.
221. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M, et al. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary microbiology*. 2010;146(1-2):24-34. Epub 2010/05/08.
222. Girard E, Kahn R, Mezouar M, Dhaussy AC, Lin T, Johnson JE, et al. The first crystal structure of a macromolecular assembly under high pressure: CpMV at 330 MPa. *Biophysical journal*. 2005;88(5):3562-71. Epub 2005/02/26.
223. Kazim AL, Atassi MZ. Prediction and conformation by synthesis of two antigenic sites in human haemoglobin by extrapolation from the known antigenic structure of sperm-whale myoglobin. *The Biochemical journal*. 1977;167(1):275-8. Epub 1977/10/01.
224. Hopp T. Computer prediction of protein surface features and antigenic determinants. *Progress in clinical and biological research*. 1985;172B:367-77. Epub 1985/01/01.
225. Carter JM. Epitope prediction methods. *Methods Mol Biol*. 1994;36:193-206. Epub 1994/01/01.
226. Florea L, Halldorsson B, Kohlbacher O, Schwartz R, Hoffman S, Istrail S. Epitope prediction algorithms for peptide-based vaccine design. *Proceedings / IEEE Computer Society Bioinformatics Conference IEEE Computer Society Bioinformatics Conference*. 2003;2:17-26. Epub 2006/07/11.

227. Caoili SE. A structural-energetic basis for B-cell epitope prediction. *Protein and peptide letters*. 2006;13(7):743-51. Epub 2006/10/05.
228. Lundegaard C, Lund O, Kesmir C, Brunak S, Nielsen M. Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics*. 2007;23(24):3265-75. Epub 2007/11/30.
229. Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, Bourne PE, et al. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W513-8. Epub 2008/06/03.
230. Sirskyj D, Diaz-Mitoma F, Golshani A, Kumar A, Azizi A. Innovative bioinformatic approaches for developing peptide-based vaccines against hypervariable viruses. *Immunology and cell biology*. 2011;89(1):81-9. Epub 2010/05/12.
231. Soam SS, Bhasker B, Mishra BN. Improved prediction of MHC class I binders/non-binders peptides through artificial neural network using variable learning rate: SARS corona virus, a case study. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011;696:223-9. Epub 2011/03/25.
232. Zhang W, Xiong Y, Zhao M, Zou H, Ye X, Liu J. Prediction of conformational B-cell epitopes from 3D structures by random forests with a distance-based feature. *BMC bioinformatics*. 2011;12:341. Epub 2011/08/19.
233. Lin HH, Zhang GL, Tongchusak S, Reinherz EL, Brusic V. Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC bioinformatics*. 2008;9 Suppl 12:S22. Epub 2009/01/06.
234. El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. On evaluating MHC-II binding peptide prediction methods. *PloS one*. 2008;3(9):e3268. Epub 2008/09/25.
235. Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Lund O, Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC bioinformatics*. 2007;8:424. Epub 2007/11/02.
236. Nyarady Z, Czompoly T, Bosze S, Nagy G, Petrohai A, Pal J, et al. Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. *Molecular immunology*. 2006;43(7):830-8. Epub 2005/08/10.
237. Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MH. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. *Methods in enzymology*. 1991;203:176-201. Epub 1991/01/01.
238. Ghosh A, Chattopadhyay S, Chawla-Sarkar M, Nandy P, Nandy A. In silico study of rotavirus VP7 surface accessible conserved regions for antiviral drug/vaccine design. *PloS one*. 2012;7(7):e40749. Epub 2012/07/31.
239. Caoili SE. Benchmarking B-cell epitope prediction for the design of peptide-based vaccines: problems and prospects. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:910524. Epub 2010/04/07.

240. Lafuente EM, Reche PA. Prediction of MHC-peptide binding: a systematic and comprehensive overview. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(28):3209-20. Epub 2009/10/29.
241. Evans MC. Recent advances in immunoinformatics: application of in silico tools to drug development. *Current opinion in drug discovery & development*. 2008;11(2):233-41. Epub 2008/02/20.
242. Wang C, Xi L, Li S, Liu H, Yao X. A sequence-based computational model for the prediction of the solvent accessible surface area for alpha-helix and beta-barrel transmembrane residues. *Journal of computational chemistry*. 2012;33(1):11-7. Epub 2011/09/22.
243. Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC bioinformatics*. 2007;8:238. Epub 2007/07/05.
244. Lara J, Wohlhueter RM, Dimitrova Z, Khudyakov YE. Artificial neural network for prediction of antigenic activity for a major conformational epitope in the hepatitis C virus NS3 protein. *Bioinformatics*. 2008;24(17):1858-64. Epub 2008/07/17.
245. Pandit MW. Prediction of strong antigenic determinant of seminalplasmin and ribonuclease from the amino acid sequence. *International journal of peptide and protein research*. 1985;25(2):197-9. Epub 1985/02/01.
246. Jan M, Meng S, Chen NC, Mai J, Wang H, Yang XF. Inflammatory and autoimmune reactions in atherosclerosis and vaccine design informatics. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:459798. Epub 2010/04/24.
247. Van Hees D, Van Gelder F. Importance of informatics and database management in transplant coordination. *Acta chirurgica Belgica*. 2008;108(1):22-6. Epub 2008/04/17.
248. Sung MH, Zhao Y, Martin R, Simon R. T-cell epitope prediction with combinatorial peptide libraries. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*. 2002;9(3):527-39. Epub 2002/08/07.
249. De Groot AS, Martin W. From immunome to vaccine: epitope mapping and vaccine design tools. *Novartis Foundation symposium*. 2003;254:57-72; discussion -6, 98-101, 250-2. Epub 2004/01/10.
250. Brusica V, Marina O, Wu CJ, Reinherz EL. Proteome informatics for cancer research: from molecules to clinic. *Proteomics*. 2007;7(6):976-91. Epub 2007/03/21.
251. McConnell P, Dash RC, Chilukuri R, Pietrobon R, Johnson K, Annechiarico R, et al. The cancer translational research informatics platform. *BMC medical informatics and decision making*. 2008;8:60. Epub 2008/12/26.
252. Nogales A, Galan C, Marquez-Jurado S, Garcia-Gallo M, Kremer L, Enjuanes L, et al. Immunogenic characterization and epitope mapping of transmissible gastroenteritis virus RNA dependent RNA polymerase. *Journal of virological methods*. 2011;175(1):7-13. Epub 2011/04/26.

253. Yu Y, Wang H, Zhao L, Zhang C, Jiang Z, Yu L. Fine mapping of a foot-and-mouth disease virus epitope recognized by serotype-independent monoclonal antibody 4B2. *J Microbiol.* 2011;49(1):94-101. Epub 2011/03/04.
254. Serruto D, Adu-Bobie J, Capecchi B, Rappuoli R, Pizza M, Maignani V. Biotechnology and vaccines: application of functional genomics to *Neisseria meningitidis* and other bacterial pathogens. *Journal of biotechnology.* 2004;113(1-3):15-32. Epub 2004/09/24.
255. Capecchi B, Serruto D, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Pizza M. The genome revolution in vaccine research. *Current issues in molecular biology.* 2004;6(1):17-27. Epub 2003/11/25.
256. Bryson CJ, Jones TD, Baker MP. Prediction of immunogenicity of therapeutic proteins: validity of computational tools. *BioDrugs.* 2010;24(1):1-8. Epub 2010/01/09.
257. Sathiamurthy M, Peters B, Bui HH, Sidney J, Mokili J, Wilson SS, et al. An ontology for immune epitopes: application to the design of a broad scope database of immune reactivities. *Immunome research.* 2005;1(1):2. Epub 2005/11/25.
258. Denisova GF, Denisov DA, Bramson JL. Applying bioinformatics for antibody epitope prediction using affinity-selected mimotopes - relevance for vaccine design. *Immunome research.* 2010;6 Suppl 2:S6. Epub 2010/11/12.
259. Rose NR. Prediction and prevention of autoimmune disease: a personal perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1109:117-28. Epub 2007/09/06.
260. De Groot AS, Moise L. Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: state of the art. *Current opinion in drug discovery & development.* 2007;10(3):332-40. Epub 2007/06/09.
261. Hraber PT, Leach RW, Reilly LP, Thurmond J, Yusim K, Kuiken C. Los Alamos hepatitis C virus sequence and human immunology databases: an expanding resource for antiviral research. *Antiviral chemistry & chemotherapy.* 2007;18(3):113-23. Epub 2007/07/14.
262. Beaver JE, Bourne PE, Ponomarenko JV. EpitopeViewer: a Java application for the visualization and analysis of immune epitopes in the Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB). *Immunome research.* 2007;3:3. Epub 2007/02/23.
263. Bui HH, Sidney J, Li W, Fusseder N, Sette A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC bioinformatics.* 2007;8:361. Epub 2007/09/28.
264. Bui HH, Sidney J, Dinh K, Southwood S, Newman MJ, Sette A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC bioinformatics.* 2006;7:153. Epub 2006/03/21.
265. Roomp K, Antes I, Lengauer T. Predicting MHC class I epitopes in large datasets. *BMC bioinformatics.* 2010;11:90. Epub 2010/02/19.

266. Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC bioinformatics*. 2009;10:296. Epub 2009/09/22.
267. Tenzer S, Peters B, Bulik S, Schoor O, Lemmel C, Schatz MM, et al. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2005;62(9):1025-37. Epub 2005/05/04.
268. Kessler JH, Melief CJ. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2007;21(9):1859-74. Epub 2007/07/06.
269. Olsen LR, Zhang GL, Reinherz EL, Brusic V. FLAVIdB: A data mining system for knowledge discovery in flaviviruses with direct applications in immunology and vaccinology. *Immunome research*. 2011;7(3):1-9. Epub 2011/12/01.
270. Sanchez-Burgos G, Ramos-Castaneda J, Cedillo-Rivera R, Dumonteil E. Immunogenicity of novel Dengue virus epitopes identified by bioinformatic analysis. *Virus research*. 2010;153(1):113-20. Epub 2010/07/20.
271. Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. *PloS one*. 2012;7(2):e32119. Epub 2012/02/23.
272. Gogolak P, Simon A, Horvath A, Rethi B, Simon I, Berkics K, et al. Mapping of a protective helper T cell epitope of human influenza A virus hemagglutinin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;270(1):190-8. Epub 2000/03/29.
273. Greenbaum JA, Kotturi MF, Kim Y, Oseroff C, Vaughan K, Salimi N, et al. Pre-existing immunity against swine-origin H1N1 influenza viruses in the general human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20365-70. Epub 2009/11/18.
274. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2003;12(5):1007-17. Epub 2003/04/30.
275. Bui HH, Sidney J, Peters B, Sathiamurthy M, Sinichi A, Purton KA, et al. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. *Immunogenetics*. 2005;57(5):304-14. Epub 2005/05/04.
276. Peters B, Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. *BMC bioinformatics*. 2005;6:132. Epub 2005/06/02.
277. Durham E, Dorr B, Woetzel N, Staritzbichler R, Meiler J. Solvent accessible surface area approximations for rapid and accurate protein structure prediction. *Journal of molecular modeling*. 2009;15(9):1093-108. Epub 2009/02/24.

278. Du Y, Xu N, Lu M, Li T. hUbiquitome: a database of experimentally verified ubiquitination cascades in humans. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2011;2011:bar055. Epub 2011/12/03.
279. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*. 2006;2:2. Epub 2006/04/26.
280. Sun J, Wu D, Xu T, Wang X, Xu X, Tao L, et al. SEPPA: a computational server for spatial epitope prediction of protein antigens. *Nucleic acids research*. 2009;37(Web Server issue):W612-6. Epub 2009/05/26.
281. Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Kesmir C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics*. 2005;57(1-2):33-41. Epub 2005/03/04.
282. Sette A, Adorini L, Colon SM, Buus S, Grey HM. Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J Immunol*. 1989;143(4):1265-7. Epub 1989/08/15.
283. Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Institute Mitteilungen*. 1994(94):1-10. Epub 1994/07/01.
284. Borghesi L, Milcarek C. From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunologic research*. 2006;36(1-3):27-32. Epub 2007/03/06.
285. Santos P, Arumemi F, Park KS, Borghesi L, Milcarek C. Transcriptional and epigenetic regulation of B cell development. *Immunologic research*. 2011;50(2-3):105-12. Epub 2011/07/01.
286. Van Regenmortel MHV. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods*. 1996;9(3):465-72. Epub 1996/06/01.
287. Rappaport I, Siegel A, Haselkorn R. Influence of the State of Subunit Aggregation on the Antigenic Specificity of Tmv and Tymv. *Virology*. 1965;25:325-8. Epub 1965/02/01.
288. Morrow PR, Rennick DM, Leung CY, Benjamini E. The antibody response to a single antigenic determinant of the tobacco mosaic virus protein: analysis using monoclonal antibodies, mutant proteins and synthetic peptides. *Molecular immunology*. 1984;21(4):301-9. Epub 1984/04/01.
289. Altschuh D, Al Moudallal Z, Briand JP, Van Regenmortel MH. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--VI. Attempts to localize viral epitopes with monoclonal antibodies. *Molecular immunology*. 1985;22(3):329-37. Epub 1985/03/01.
290. Petrovsky N, Silva D, Brusica V. The future for computational modelling and prediction systems in clinical immunology. *Novartis Foundation symposium*. 2003;254:23-32; discussion 3-42, 98-101, 250-2. Epub 2004/01/10.
291. Kim Y, Sette A, Peters B. Applications for T-cell epitope queries and tools in the Immune Epitope Database and Analysis Resource. *Journal of immunological methods*. 2011;374(1-2):62-9. Epub 2010/11/05.

292. Beutling U, Stading K, Stradal T, Frank R. Large-scale analysis of protein-protein interactions using cellulose-bound peptide arrays. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2008;110:115-52. Epub 2008/04/18.
293. Soutullo A, Santi MN, Perin JC, Beltramini LM, Borel IM, Frank R, et al. Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2007;20(4):227-37. Epub 2007/08/21.
294. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*. 1990;276(1-2):172-4. Epub 1990/12/10.
295. Diez-Rivero CM, Chenlo B, Zuluaga P, Reche PA. Quantitative modeling of peptide binding to TAP using support vector machine. *Proteins*. 2010;78(1):63-72. Epub 2009/08/26.
296. Emmerich NP, Nussbaum AK, Stevanovic S, Priemer M, Toes RE, Rammensee HG, et al. The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(28):21140-8. Epub 2000/05/10.
297. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(1):1-12. Epub 2001/07/04.
298. Tenzer S, Stoltze L, Schonfisch B, Dengjel J, Muller M, Stevanovic S, et al. Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. *J Immunol*. 2004;172(2):1083-91. Epub 2004/01/07.
299. Bhasin M, Lata S, Raghava GP. TAPPred prediction of TAP-binding peptides in antigens. *Methods Mol Biol*. 2007;409:381-6. Epub 2008/05/03.
300. Daniel S, Brusica V, Caillat-Zucman S, Petrovsky N, Harrison L, Riganelli D, et al. Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J Immunol*. 1998;161(2):617-24. Epub 1998/07/22.
301. Garcia-Boronat M, Diez-Rivero CM, Reinherz EL, Reche PA. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W35-41. Epub 2008/04/30.
302. Wingfield PT, Stahl SJ, Thomsen DR, Homa FL, Booy FP, Trus BL, et al. Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus. *Journal of virology*. 1997;71(12):8955-61. Epub 1997/11/26.
303. Warren RL, Holt RA. A census of predicted mutational epitopes suitable for immunologic cancer control. *Human immunology*. 2010;71(3):245-54. Epub 2009/12/29.
304. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities



- for peptides of length 8-11. *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W509-12. Epub 2008/05/09.
305. Nussbaum AK, Kuttler C, Hadeler KP, Rammensee HG, Schild H. PProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics*. 2001;53(2):87-94. Epub 2001/05/11.
306. Peters B, Bulik S, Tampe R, Van Endert PM, Holzhutter HG. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J Immunol*. 2003;171(4):1741-9. Epub 2003/08/07.
307. Zhang GL, Petrovsky N, Kwoh CK, August JT, Brusica V. PRED(TAP): a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing. *Immunome research*. 2006;2:3. Epub 2006/05/25.
308. Altschuh D, Hartman D, Reinbolt J, Van Regenmortel MH. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--V. Localization of four epitopes in the protein subunit by inhibition tests with synthetic peptides and cleavage peptides from three strains. *Molecular immunology*. 1983;20(3):271-8. Epub 1983/03/01.
309. De LMRC, van Regenmortel MH. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--III. Demonstration of five antigenic regions in the protein sub-unit. *Molecular immunology*. 1979;16(3):179-84. Epub 1979/03/01.
310. Altschuh D, Van Regenmortel MH. Localization of antigenic determinants of a viral protein by inhibition of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with tryptic peptides. *Journal of immunological methods*. 1982;50(1):99-108. Epub 1982/01/01.
311. Dekker EL, Porta C, Van Regenmortel MH. Limitations of different ELISA procedures for localizing epitopes in viral coat protein subunits. *Archives of virology*. 1989;105(3-4):269-86. Epub 1989/01/01.
312. Tsurui H, Takahashi T. Prediction of T-cell epitope. *Journal of pharmacological sciences*. 2007;105(4):299-316. Epub 2007/12/21.
313. Mohabatkar H. Prediction of epitopes and structural properties of Iranian HPV-16 E6 by bioinformatics methods. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2007;8(4):602-6. Epub 2008/02/12.
314. Schuler MM, Nastke MD, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction. *Methods Mol Biol*. 2007;409:75-93. Epub 2008/05/03.
315. Gruber A, Brocker T. MHC class I-positive dendritic cells (DC) control CD8 T cell homeostasis in vivo: T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells. *J Immunol*. 2005;175(1):201-6. Epub 2005/06/24.
316. Chemali M, Radtke K, Desjardins M, English L. Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(9):1533-41. Epub 2011/03/11.
317. Trifonov V, Racaniello V, Rabadan R. The Contribution of the PB1-F2 Protein to the Fitness of Influenza A Viruses and its Recent Evolution in the 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic Virus. *PLoS currents*. 2009;1:RRN1006. Epub 2009/12/24.

318. Ozawa M, Basnet S, Burley LM, Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y. Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses. *Journal of virology*. 2011;85(9):4596-601. Epub 2011/02/18.
319. Grattinger M, Hohenberg H, Thomas D, Wilk T, Muller B, Krausslich HG. In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology*. 1999;257(1):247-60. Epub 1999/04/20.
320. Kuhlmann U, Sarkar S, Rohde W. Capsid protein gene sequences of four tobacco mosaic virus strains defective for virus assembly. *Nucleic acids research*. 1993;21(14):3325. Epub 1993/07/11.
321. Schlosser G, Mezo G, Kiss R, Vass E, Majer Z, Fejlbrieff M, et al. Synthesis, solution structure analysis and antibody binding of cyclic epitope peptides from glycoprotein D of Herpes simplex virus type I. *Biophysical chemistry*. 2003;106(2):155-71. Epub 2003/10/15.
322. Homa FL, Brown JC. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Reviews in medical virology*. 1997;7(2):107-22. Epub 1997/07/01.
323. Grey HM, Ruppert J, Vitiello A, Sidney J, Kast WM, Kubo RT, et al. Class I MHC-peptide interactions: structural requirements and functional implications. *Cancer surveys*. 1995;22:37-49. Epub 1995/01/01.
324. Kesmir C, Nussbaum AK, Schild H, Detours V, Brunak S. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein engineering*. 2002;15(4):287-96. Epub 2002/05/02.
325. Lam TH, Mamitsuka H, Ren EC, Tong JC. TAP Hunter: a SVM-based system for predicting TAP ligands using local description of amino acid sequence. *Immunome research*. 2010;6 Suppl 1:S6. Epub 2010/09/30.
326. Broor S, Bharaj P. Avian and human metapneumovirus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1102:66-85. Epub 2007/05/02.
327. Seal BS, Sellers HS, Meinersmann RJ. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus research*. 2000;66(2):139-47. Epub 2000/03/22.
328. Hervas D, Reina J, Yanez A, Del Valle JM, Figuerola J, Hervas JA. Epidemiology of hospitalization for acute bronchiolitis in children: differences between RSV and non-RSV bronchiolitis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2012;31(8):1975-81. Epub 2012/01/14.
329. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(3):546-57. Epub 2006/07/19.
330. Cook JK. Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. *Vet J*. 2000;160(2):118-25. Epub 2000/09/14.

331. Maharaj SB, Thomson DK, da Graca JV. Isolation of an avian pneumovirus-like agent from broiler breeder chickens in South Africa. *The Veterinary record*. 1994;134(20):525-6. Epub 1994/05/14.
332. Juhasz K, Easton AJ. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *The Journal of general virology*. 1994;75 ( Pt 11):2873-80. Epub 1994/11/01.
333. Cook JK, Chesher J, Orthel F, Woods MA, Orbell SJ, Baxendale W, et al. Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2000;29(6):545-56. Epub 2000/12/01.
334. Ganapathy K, Bufton A, Pearson A, Lemiere S, Jones RC. Vaccination of commercial broiler chicks against avian metapneumovirus infection: a comparison of drinking-water, spray and oculo-oral delivery methods. *Vaccine*. 2010;28(23):3944-8. Epub 2010/04/16.
335. Ling R, Sinkovic S, Toquin D, Guionie O, Eterradosi N, Easton AJ. Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 2):525-33. Epub 2008/01/17.
336. Duraes-Carvalho R, Souza AR, Martins LM, Sprogis AC, Bispo JA, Bonafe CF, et al. Effect of High Hydrostatic Pressure on *Aeromonas hydrophila* AH 191 Growth in Milk. *Journal of food science*. 2012;77(8):M417-M24. Epub 2012/08/07.
337. Kovac K, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D. Effect of high hydrostatic pressure processing on norovirus infectivity and genome stability in strawberry puree and mineral water. *International journal of food microbiology*. 2012;152(1-2):35-9. Epub 2011/11/03.
338. Sanchez G, Aznar R, Martinez A, Rodrigo D. Inactivation of human and murine norovirus by high-pressure processing. *Foodborne pathogens and disease*. 2011;8(2):249-53. Epub 2010/11/03.
339. Ferreira E, Mendes YS, Silva JL, Galler R, Oliveira AC, Freire MS, et al. Effects of hydrostatic pressure on the stability and thermostability of poliovirus: a new method for vaccine preservation. *Vaccine*. 2009;27(39):5332-7. Epub 2009/07/21.
340. Ritz M, Courcoux P, Semenou M, Federighi M. High hydrostatic pressure inactivation of *Salmonella typhimurium*: effects of pressure, duration, pH and temperature studied by analysis of variance. *Veterinary research*. 1998;29(6):547-56. Epub 1998/12/16.
341. Tian SM, Ruan KC, Qian JF, Shao GQ, Balny C. Effects of hydrostatic pressure on the structure and biological activity of infectious bursal disease virus. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2000;267(14):4486-94. Epub 2000/07/06.
342. Kingsley DH, Chen H, Hoover DG. Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure. *Virus research*. 2004;102(2):221-4. Epub 2004/04/16.




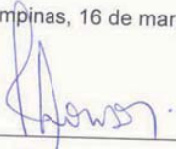
343. Lori S, Buckow R, Knorr D, Heinz V, Lehmacher A. Predictive model for inactivation of *Campylobacter* spp. by heat and high hydrostatic pressure. *Journal of food protection*. 2007;70(9):2023-9. Epub 2007/09/29.
344. Isbarn S, Buckow R, Himmelreich A, Lehmacher A, Heinz V. Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure. *Journal of food protection*. 2007;70(3):667-73. Epub 2007/03/29.
345. Ceylan C, Severcan F, Ozkul A, Severcan M, Bozoglu F, Taheri N. Biophysical and microbiological study of high hydrostatic pressure inactivation of Bovine Viral Diarrheavirus type 1 on serum. *Veterinary microbiology*. 2012;154(3-4):266-71. Epub 2011/08/25.
346. Dani MA, Durigon EL, Arns CW. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. *Journal of virological methods*. 1999;79(2):237-41. Epub 1999/06/25.
347. D'Arce RC, Coswig LT, Almeida RS, Trevisol IM, Monteiro MC, Rossini LI, et al. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2005;34(2):133-6. Epub 2005/09/30.
348. LaBarre DD, Lowy RJ. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID<sub>50</sub> and plaque assays. *Journal of virological methods*. 2001;96(2):107-26. Epub 2001/07/11.
349. Habel K, Salzman NP, Baron S. *Fundamental techniques in virology*. New York,: Academic Press; 1969. xx, 527 p. p.
350. Rutberg L. On the Effects of High Hydrostatic Pressure on Bacteria and Bacteriophage. 2. Inactivation of Bacteriophages. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1964;61:91-7. Epub 1964/01/01.
351. Silva JL, Luan P, Glaser M, Voss EW, Weber G. Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *Journal of virology*. 1992;66(4):2111-7. Epub 1992/04/01.
352. Bonafe CF, Glaser M, Voss EW, Weber G, Silva JL. Virus inactivation by anilino-naphthalene sulfonate compounds and comparison with other ligands. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275(3):955-61. Epub 2000/09/07.
353. Lou F, Neetoo H, Li J, Chen H. Lack of correlation between virus barosensitivity and the presence of a viral envelope during inactivation of human rotavirus, vesicular stomatitis virus, and avian metapneumovirus by high-pressure processing. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(24):8538-47. Epub 2011/10/18.
354. Chong PL, van der Meer BW, Thompson TE. The effects of pressure and cholesterol on rotational motions of perylene in lipid bilayers. *Biochimica et biophysica acta*. 1985;813(2):253-65. Epub 1985/03/14.
355. Gross M, Jaenicke R. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1994;221(2):617-30. Epub 1994/04/15.

356. LaCasse RA, Follis KE, Trahey M, Scarborough JD, Littman DR, Nunberg JH. Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV. *Science*. 1999;283(5400):357-62. Epub 1999/01/15.
357. Cook JK, Ellis MM, Dolby CA, Holmes HC, Finney PM, Huggins MB. A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 1. Stability of the attenuated strain. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 1989;18(3):511-22. Epub 1989/07/01.
358. Kingsley DH, Hoover DG, Papafragkou E, Richards GP. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *Journal of food protection*. 2002;65(10):1605-9. Epub 2002/10/17.
359. Dormitzer PR, Ulmer JB, Rappuoli R. Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines. *Trends in biotechnology*. 2008;26(12):659-67. Epub 2008/11/04.
360. Carmicle S, Steede NK, Landry SJ. Antigen three-dimensional structure guides the processing and presentation of helper T-cell epitopes. *Molecular immunology*. 2007;44(6):1159-68. Epub 2006/08/09.
361. Thai R, Moine G, Desmadril M, Servent D, Tarride JL, Menez A, et al. Antigen stability controls antigen presentation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(48):50257-66. Epub 2004/09/15.
362. Jorgensen KW, Buus S, Nielsen M. Structural properties of MHC class II ligands, implications for the prediction of MHC class II epitopes. *PloS one*. 2010;5(12):e15877. Epub 2011/01/07.
363. Hubbard SJ, Eisenmenger F, Thornton JM. Modeling studies of the change in conformation required for cleavage of limited proteolytic sites. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1994;3(5):757-68. Epub 1994/05/01.
364. Hubbard SJ, Beynon RJ, Thornton JM. Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures. *Protein engineering*. 1998;11(5):349-59. Epub 1998/07/29.
365. Dai G, Carmicle S, Steede NK, Landry SJ. Structural basis for helper T-cell and antibody epitope immunodominance in bacteriophage T4 Hsp10. Role of disordered loops. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):161-8. Epub 2001/10/17.
366. Dai G, Steede NK, Landry SJ. Allocation of helper T-cell epitope immunodominance according to three-dimensional structure in the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein gp120. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(45):41913-20. Epub 2001/09/12.
367. Villadangos JA, Ploegh HL. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity*. 2000;12(3):233-9. Epub 2001/02/07.
368. Somero GN. Protein adaptations to temperature and pressure: complementary roles of adaptive changes in amino acid sequence and internal milieu. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*. 2003;136(4):577-91. Epub 2003/12/10.

369. Carmicle S, Dai G, Steede NK, Landry SJ. Proteolytic sensitivity and helper T-cell epitope immunodominance associated with the mobile loop in Hsp10s. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):155-60. Epub 2001/10/24.
370. Landry SJ. Helper T-cell epitope immunodominance associated with structurally stable segments of hen egg lysozyme and HIV gp120. *Journal of theoretical biology*. 2000;203(3):189-201. Epub 2000/03/16.
371. Landry SJ. Local protein instability predictive of helper T-cell epitopes. *Immunology today*. 1997;18(11):527-32. Epub 1997/12/05.
372. Surman S, Lockey TD, Slobod KS, Jones B, Riberdy JM, White SW, et al. Localization of CD4+ T cell epitope hotspots to exposed strands of HIV envelope glycoprotein suggests structural influences on antigen processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(8):4587-92. Epub 2001/04/05.
373. C.J. Sandroff HEKJ, D.R. Herschbach. High pressure study of the liquid/solid interface: Surface enhanced Raman scattering from adsorbed molecules. *J Phys Chem*. 1984;88. Epub 5653.
374. Brandts JF, Oliveira RJ, Westort C. Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on the denaturation of ribonuclease A. *Biochemistry*. 1970;9(4):1038-47. Epub 1970/02/17.
375. Caspar DL. Assembly and Stability of the Tobacco Mosaic Virus Particle. *Adv Protein Chem*. 1963;18:37-121. Epub 1963/01/01.
376. Wang H, Planchart A, Stubbs G. Caspar carboxylates: the structural basis of tobamovirus disassembly. *Biophysical journal*. 1998;74(1):633-8. Epub 1998/02/04.
377. Culver JN, Dawson WO, Plonk K, Stubbs G. Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology*. 1995;206(1):724-30. Epub 1995/01/10.

Anexos

## 8.1 Parecer do comitê de ética

 UNICAMP	 CEEA/Unicamp
<b>Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp</b>	
<b>CERTIFICADO</b>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº <u>1717-2</u>, sobre "<u>Potencial vacinal de vírus inativados por alta pressão hidrostática e mapeamento de epítopos de interesse biotecnológico: estudo em camundongos</u>", sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé / Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado / Joelma Mauricio Vieira</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em <u>16 de março de 2009</u>.</p>	
<b>CERTIFICATE</b>	
<p>We certify that the protocol nº <u>1717-2</u>, entitled "<u>Vaccinal potential of virus inactivated by high hydrostatic pressure and epitope mapping with biotechnological impact: study in mice</u>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on <u>March 16, 2009</u>.</p>	
Campinas, 16 de março de 2009.	
 _____ Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 _____ Fátima Alogso Secretária Executiva
<small>CEEA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil</small>	<small>Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: <a href="mailto:comisib@unicamp.br">comisib@unicamp.br</a> <a href="http://www.ib.unicamp.br/ceea/">http://www.ib.unicamp.br/ceea/</a></small>





## 8.1 Artigos

### 8.1.1 Epitope mapping of tobacco mosaic virus capsid protein: prediction and experimental data from spot synthesis



#### Epitope Mapping of Tobacco Mosaic Virus Capsid Protein: Prediction and Experimental Data from Spot Synthesis

Daniel Ferreira de Lima Neto<sup>1</sup>, Clarice Wels Arns<sup>1</sup>, Dagmar Ruth Stach-Machado<sup>2</sup>, Fernando Rosado Spillk<sup>3</sup>, Juliana Maffoso<sup>4</sup> and Carlos Francisco Sampaio Bonafé<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Laboratório de Virologia Animal, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, Brazil

#### Abstract

The immune system is a network of thousands of molecules, cells and regulatory factors that produce many interrelated responses. In this study, we used spot synthesis to map tobacco mosaic virus (TMV) epitopes in a mice animal model (Balb/c) and compared the results with those obtained using immunoinformatic prediction tools. Mice were inoculated with TMV and after immunization the sera were incubated with an array of overlapping pentadecapeptides that corresponded to the full sequence of the TMV capsid protein (TMVcp) that had been synthesized on a cellulose membrane for spot synthesis analysis. Six linear epitopes were identified experimentally, as shown by the IgG-elicited immune responses in mice. The data for epitope prediction based on epitope databases agreed with the results obtained by spot synthesis results. Comparison of the findings for spot intensities and those obtained with the prediction software allowed the identification of different responses according to the MHC class I alleles. The results of this work provide a detailed antigenic profile for TMV.

**Keywords:** Tobacco mosaic virus; Epitope mapping; Spot synthesis

#### Introduction

Tobacco mosaic virus (TMV) is an extensively studied virus model in numerous biological systems and, consequently, has become one of the best known viruses, alongside human immunodeficiency virus (HIV). The widespread use of TMV reflects the ease with which this virus can be manipulated, produced and purified. Studies of TMV have provided important insights into immunology and virology [1-3]. The TMV virion consists of a rod-shaped structure with 2130 identical protein subunits surrounding the genetic material (a single positive RNA strand). The capsid protein (TMVcp) subunit, which consists of 159 amino acids, is arranged as a right-handed antiparallel helical bundle composed of four  $\alpha$ -helices, the left and right skewed (LS and RS) and left and right radial (LR and RR). A short inner loop connects the LS and RS helices while a longer one connects the LR and RR helices. The RNA binding site is formed by residues from the loops and the LR helix, and the N and C termini are located on the outer surface of the virion. The ability of TMVcp to aggregate is important for virus stability and assembly and is directly related to viral physiology [4,5]. The study of physical chemical properties of TMV is important to understand its physiology. We investigated the dissociation process by using of high pressure at low temperature ( $\leq 0^\circ\text{C}$ ) [6], alkaline conditions [7] and presence of urea [8]. A combination of high pressure and such conditions revealed a potential tool for study of viral stability.

Several studies aimed at improving our understanding of structural factors and antigenicity have identified different antibody binding sites during the immune responses elicited by virus inoculation [4,9,10]. The immune system is a network of thousands of molecules, cells and regulatory factors that mediate many interrelated responses. Studies over the past few years have reported individual variation in the immune response as well as temporal changes within the host [11]. Advanced computational methods provide a valuable tool for analyzing complex experimental data. With such methods it is possible to identify specific patterns in the immune response based solely on protein sequences and to correlate these findings with experimental data; molecular predictions based on such analyses are widely used in

the literature [12,13]. In the present study, we used spot analysis to map the TMV epitopes and compared our findings with data from other studies in the literature. We also used immunoinformatics tools to map the potential B- and T-cell epitopes and compared these data with the results of epitope mapping.

#### Material and Methods

##### TMV purification and RNA sequencing

TMV was isolated from Turkish plants infected with the common strain of the virus. The purification method was described previously [14].

RNA from the reference virus strain was extracted with TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), quantified by spectrophotometry and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until used. For reverse transcription, RNA (50  $\mu\text{g}$ ) was converted to cDNA using Superscript III reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions. The reactions were done using diethylpyrocarbonate (DEPC) water in sterile conditions. The polymerase chain reactions (PCR) were done by adding 10% of the RT reaction to a final volume of 50  $\mu\text{L}$ . 10 % of the reverse transcriptase reaction was used as input for the PCR reaction. The PCR mixture consisted of 5  $\mu\text{L}$ .

\*Corresponding author: Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, 13083-862, SP, Brazil; Tel: +55 19 35216229; Fax: +55 19 35216129; E-mail: [bonafe@unicamp.br](mailto:bonafe@unicamp.br)

Received October 03, 2012; Accepted October 22, 2012; Published October 24, 2012

Citation: de Lima Neto DF, Arns CW, Stach-Machado DR, Spillk FR, Maffoso J, et al. (2012) Epitope Mapping of Tobacco Mosaic Virus Capsid Protein: Prediction and Experimental Data from Spot Synthesis. Mol Biol 1:108. doi:10.4172/2168-9547.1000108

Copyright: © 2012 de Lima Neto DF, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Daniel Ferreira de Lima Neto<sup>1</sup>, Clarice Weis Arns<sup>1</sup>, Dagmar Ruth Stach-Machado<sup>2</sup>, Fernando Rosado Spilki<sup>3</sup>, Juliana Mattoso<sup>4</sup> and Carlos Francisco Sampaio Bonafe<sup>4\*</sup>**

*<sup>1</sup>Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, 13083-862, SP, Brazil*

*<sup>2</sup>Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, 13083-862, SP, Brazil*

*<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 93352-000, RS, Brazil*

*<sup>4</sup>Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, 13083-862, SP, Brazil*

*\*Corresponding author: Carlos Francisco Sampaio Bonafe, Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária Zeferino*

*Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255, Campinas, 13083-862, SP, Brazil, Phone 55 19  
35216229, FAX 55 19 35216129; E-mail: bonafe@unicamp.br.*

## Abstract

The immune system is a network of thousands of molecules, cells and regulatory factors that produce many interrelated responses. In this study, we used spot synthesis to map tobacco mosaic virus (TMV) epitopes in a mice animal model (Balb/c) and compared the results with those obtained using immunoinformatic prediction tools. Mice were inoculated with TMV and after immunization the sera were incubated with an array of overlapping pentadecapeptides that corresponded to the full sequence of the TMV capsid protein (TMVcp) that had been synthesized on a cellulose membrane for spot synthesis analysis. Six linear epitopes were identified experimentally, as shown by the IgG-elicited immune responses in mice. Epitope prediction algorithms found antigenic regions in silico. Comparison of the findings for spot intensities and those obtained by the prediction software allowed the identification of different responses according to the MHC class I and II alleles from Balb/C mice and linear B cell epitopes. The results of this work provide a detailed antigenic profile for TMVcp.

**Keywords:** Tobacco mosaic virus; epitope mapping; spot synthesis.

## Introduction

Tobacco mosaic virus (TMV) is an extensively studied virus model in numerous biological systems and, consequently, has become one of the best known viruses, alongside human immunodeficiency virus (HIV). The widespread use of TMV reflects the ease with which this virus can be manipulated, produced and purified. Studies of TMV have provided important insights into immunology and virology (87, 89, 287). The TMV virion consists of a rod-shaped structure with 2130 identical protein subunits surrounding the genetic material (a single positive RNA strand). The capsid protein (TMVcp) subunit, which consists of 159 amino acids, is arranged as a right-handed antiparallel helical bundle composed of four  $\alpha$ -helices, the left and right slewed (LS and RS) and left and right radial (LR and RR). A short inner loop connects the LS and RS helices while a longer one connects the LR and RR helices. The RNA binding site is formed by residues from the loops and the LR helix, and the N and C termini are located on the outer surface of the virion. The ability of TMVcp to aggregate is important for virus stability and assembly and is directly related to viral physiology (28, 98). The study of physical chemical properties of TMV is important to understand its physiology. We investigated the dissociation process by using of high pressure at low temperature ( $\leq 0$  °C)(208), alkaline conditions (48) and presence of urea(210). A combination of high pressure and such conditions revealed a potential tool for study of viral stability.

Several studies aimed at improving our understanding of structural factors and antigenicity have identified different antibody binding sites during the immune responses elicited by virus inoculation (98, 288, 289). The immune system is a network of thousands of molecules, cells and regulatory factors that mediate many interrelated responses. Studies over the past few years have reported individual variation in the immune response as well as temporal changes within the host (290). Advanced computational methods provide a valuable tool for analyzing complex experimental data. With such methods it is possible to identify specific patterns in the immune response based solely on protein sequences and to correlate these findings with experimental data; molecular predictions based on such analyses are widely used in the literature (265, 291). In the present study, we used spot analysis to map the TMV epitopes and compared our findings with data from other studies in the literature. We also used immunoinformatics tools to map the potential B- and T-cell epitopes and compared these data with the results of epitope mapping.

## **Material and methods**

### TMV RNA sequencing

RNA from the reference virus strain was extracted with TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), quantified by spectrophotometry and stored at -80 °C until used. For reverse transcription, RNA (50 µg) was converted to cDNA using Superscript III reverse transcriptase, according to the manufacturer's instructions. The reactions were



done using diethyl-pyrocabonate (DEPC) water in sterile conditions. The polymerase chain reactions (PCR) were done by adding 10% of the RT reaction to a final volume of 50  $\mu$ L. 10 % of the reverse transcriptase reaction was used as input for the PCR reaction. The PCR mixture consisted of 5  $\mu$ L of each primer (5 pmol), 5  $\mu$ L of 10x buffer, 1  $\mu$ L of dNTPs (0.2 mM), 2  $\mu$ L of DTT, 0.5  $\mu$ L of *Taq* DNA polymerase and DEPC water to a final volume of 50  $\mu$ L. The PCR products were visualized in 2% agarose gels stained with ethidium bromide and then analyzed in a MEGABace 1000 sequencer following the manufacturer instructions. Flanking primers for the complete sequence of the TMVcp were used. The electropherogram of the sequences were aligned using the DNASTar software package (SeqMan) and the consensus sequence was exported to BLAST and to Protean (DNASTar).The amino acid sequence was deduced from the full nucleotide sequence using DNASTar software. Local alignment and basic protein structure properties were calculated using the CLC Main Workbench 5.5® (protein toolbox) and Lasergene DNASTar® software (EditSeq and SeqMan) packages.

#### Preparation of peptide arrays and epitope identification

Peptides based on the amino acid sequence determined above were synthesized by using Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) chemistry (137, 292) on PEG-derivatized cellulose membranes with an additional  $\beta$  Ala anchor for the C-terminal immobilized peptides. The membranes contained overlapping

pentadecapeptides spanning the complete sequence of TMVcp (residues 1–159), with an offset of three amino acid residues.

#### Serum preparation and antibody-binding assay and quantification

Balb/c female mice (n=5) obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB/UNICAMP) were inoculated with native TMV and complete Freund adjuvant in the first inoculation and incomplete adjuvant in subsequent inoculations. The inoculations were done on the 1st, 15th, 28th and 35th day using 15, 10, 10 and 15 µg of TMV, respectively. Blood was collected 14 days after the last inoculation, pooled and allowed to clot, after which the serum was obtained by centrifugation, inactivated by incubating for 1 h at 56 °C and stored at 4 °C. Control serum was obtained from five mice inoculated with porcine parvovirus using the same scheme as for TMV. The protocols involving animals were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Use (CEUA/UNICAMP, protocol no. 1717-2).

The antibody-binding assay used was described by Beutling, Stading et al. (2008)(292). A serum dilution of 1/100 was used in the membrane antibody-binding assays. An alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (AP-IgG) (Jackson Immuno Research, CAT no. 115-055-071) was used as secondary antibody to detect bound antibodies. The color reaction was developed as described elsewhere (293), with an incubation time of up to 60 min. The membrane was subsequently scanned at 2400 d.p.i. with a table scanner and the software

package Totallab Quant – Array Analysis was used to measure the intensity of each spot against the background intensity. The results were expressed as the mean for each spot. The membranes were regenerated as described by Beutling, Stading et al. (2008).

#### An epitope-based immunoinformatics study of TMVcp

The deduced protein sequence used was aligned with the protein sequence of TMV capsid protein retrieved from the National Centre for Biotechnology Institute (NCBI) database (BLAST reference accession no. ACY41215.1). Epitope flexibility was predicted with the Karplus and Schulz flexibility scale (146) and antigenicity was predicted with the Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale (294). Hydrophobicity and hydrophilicity were analyzed with the Parker hydrophilicity scale. The Kyte-Doolittle hydrophobicity index (147) available from the ExPASy Prot scale server was used to assess the distribution of polar and apolar residues along the protein sequence. The Kyte-Doolittle scale (window size of 7 and cutoff of 1.6) is widely used to examine the hydrophobic character of proteins and is useful in predicting membrane-spanning domains, potential antigenic sites and regions that are likely to be exposed on the protein surface. This approach was complemented with the Hopp method for a window size of 7-mers (147, 148). Ubiquitination sites were predicted as described elsewhere (295). Proteasomal cleavage sites were predicted based on proteasomal degradation experiments with  $\beta$ -casein (296), enolase (297) and prion proteins (298). The prediction of TAP

affinity was based on a support vector machine (SVM) (295). The SVMHC (support vector MHC) method was used to predict MHC binding (299). This is an SVM-based method based on verified MHC binding peptides from the SYFPEITHI database (237). These methods have been validated elsewhere (300). Data available from the ExPASy Prot scale server were used to counter-verify the *in silico* data (301).

#### Combining the prediction methods

The class II MHC algorithm and the linear and conformational B cell epitope prediction algorithms were used to simulate the processing pathways for which there are *in silico* prediction algorithms, particularly with regard to the virus and host used here.

The separate prediction methods were combined in order to model the entire processing pathway of MHC class I antigens. Predicted peptides should have a C terminus generated by the proteasome, a relatively high TAP affinity and some affinity for MHC molecules. The high accuracy of the final step of MHC binding prediction means that other methods can be used as filters to remove candidate peptides unlikely to be generated by proteasomal cleavage and/or transported by TAP. Peptides nine amino acids long (9-mer peptides) were extracted from the SYFPEITHI database (302). We focused on 9-mer peptides because MHC class I binds these peptides more frequently than 8-, 10- or 11-mer peptides. The alleles Kd, Dd and Ld influence epitope display in Balb/C mice and

were used to map the potential epitopes of TMVcp. The tentative epitopes were predicted with the PCM, SVM-TAP and SVMHC methods (229, 265, 291, 303, 304). In the first step of analysis, the protein sequences were screened individually for the best binding epitopes by using the Immune Epitope Database (IEDB) algorithm. The cutoff scores were adjusted by the algorithm itself.

## Results

The PCR-amplified TMVcp sequence determined by sequencing is shown below. A BLASTn search revealed that the sequence shared 100% homology with a sequence retrieved from the National Center for Biotechnology Institute (NCBI) database (accession no. ACY41215.1).

```
TTTAATCGATGATGATTCAGAGACTACTGTCGCCGAATCGGATTCGTTT
TAAATATGTCTTACAGTATCACTACTCCATCTCAGTTCGTGTTCTTGTCATCAG
CGTGGGCCGACCCGATAGAGTTAATTAATTTATGTACTAATGCCTTAGGAAAT
CAGTTTCAAACACAACAAGCTAGAACTGTCGTTCAACGACAATTCAGTGAGGT
GTGGAAACCTTCACCCACAAGTAACTGTTAGGTTCCCTGACAGCGACTTTAAG
GTGTACAGGTACAATGCGGTGTTAGACCCGCTAGTCACTGCACTGTTAGGTG
CGTTTGACACTAGAAATAGAATAATAGAAGTTGAAAATCAGGCGAACCCACG
ACTGCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGACGACGCAACGGTGGCCA
TAAGGAGCGCGATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGTACCGGATCT
```

TATAATCGGAGCTCTTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCTAGTCC  
 TGCAACTTGAGGTAATCAAGATGCATAATAAATAACGGATTGTGTCCGTAATC  
 ACACGTGGTGCGTACGATAACGCATAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAG  
 GGTTGTGTCTTGGATCGCGCGGGTCAAATGTATATGGTTCCATA

The corresponding amino acid sequence (determined by CLC Workbench software) was

MSYSITTPSQFVFLSSAWADPIELINLCTNALGNQFQTQQARTVVQRQFSEVWKPSPPQVTVRFPDSDFKVYRY  
 NAVLDPLVTALLGAFDTRNRIIEVENQANPTTAETLDATRRVDATVAIRSAINNLIVELIRGTGSYNRSSFESSGLV  
 WTSSPAT

Mice sera was titrated by ELISA and produced the following results for serial dilution testing (table 1).

Control	TMVcp-immunized mice sera
<b>0</b>	0.000
<b>2</b>	1.906
<b>1</b>	<b>1.592</b>
<b>0.5</b>	1.119
<b>0.25</b>	1.034
<b>0.125</b>	0.476
<b>0.0625</b>	0.330
<b>0.03125</b>	0.148

**Table 1: ELISA quantification of the sera from immunized mice against TMV coat protein**

To investigate the regions of TMVcp that were recognized by serum of immunized Balb/c mice, 49 overlapping decapentapeptides based on the deduced amino acid sequence of the protein were synthesized as an array on a cellulose membrane. Figure 1 shows the results for serum from mice inoculated with porcine parvovirus (A; negative control) and serum from TMV-immunized mice (B) when incubated with membrane-bound peptides. Significant antibody binding was observed with the latter serum compared to the control, which showed no detectable binding. Figure 2 shows the decapentapeptides sequences and the signal intensity of the positive samples (columns) after correction for the control. The underlined amino acids shown on the right side of Figure 2 correspond to previous reports of epitope mapping (49, 87, 288).

We found five strongly reactive regions: A10-A16 (residues 28-60), A20-A23 (residues 58-81), B4-B7 (residues 85-108), B16-B17 (residues 121-138) and B20-B24 (residues 133-159), and two weaker or less reactive regions: A4-A7 (residues 10-33) and A25-B1 (residues 73-90). The strong binding regions corresponded to  $\alpha$ -helices that mainly projected away from the RNA binding site.

Initial protein analysis with CLC Workbench 5.5® and Lasergene DNASTar® showed that the TMVcp had a calculated molecular mass of 17,636 Da, an isoelectric point of 5.67 and an aliphatic index of 85.8 with 75 hydrophobic residues (A,F,G,I,L,M,P,V,W; frequency of 0.472) and 57 hydrophilic residues (C,N,Q,S,T,Y;

frequency of 0.358). Figure 3 shows the antigenicity and hydrophobicity profiles predicted with the Hopp-Woods and Kyte-Doolittle algorithm, respectively.

Antigenicity and hydrophobicity predictions for the TMVcp identified a region between amino acid positions 28 and 60 that scored well for both parameters (Figure 3). Analysis of Figure 3 shows that the two plots were very symmetrical and appeared as a near mirror image of each other (in the Hopp-Woods plot apolar regions have negative values while in the Kyte-Doolittle plot these regions have positive values). The Kolaskar and Tongaonkar “antigenicity plot” (294) also predicted antigenic regions at positions 16-39, 42-48, 68-77, 79-88 and 104-125 (not shown). Together, these findings identified four major peaks of antigenicity that corresponded to the regions where the epitopes were mapped. The peaks in these regions were polar in nature and were also accessible in the Kyte-Doolittle plot. In contrast, the regions containing residues 30-70, 90-120 and 135-145 had negative values, i.e., they were hydrophilic.

#### Prediction of solvent-accessible areas

The exposed fragments were studied by using surface accessible area software to assess which regions were available for further interactions such as antibody binding or capsid assembly. This software takes into account polarity, hydrophobicity and atomic radius to calculate which residues are located on the surface or buried within the protein. The results, depicted as scores given by the algorithm, are shown in Figure 4. The regions identified in this analysis are normally exposed on the surface of TMVcp and mediate the multiple interactions



involved in capsid assembly in infected cells; they are also considered to be protective epitopes.

Based on the biochemical properties of each amino acid residue it is possible to predict the accessible area of a given protein and to determine which residues are exposed or buried within the structure of the protein. Other parameters taken into account by the algorithm include the solvent accessible surface area and atomic solvation. Residues with values >60 (threshold) are considered to be located externally (on the outer surface) while those with values <60 are located internally (within the molecule). The residues identified on the surface of TMVcp were 3-15, 21-37, 57-60, 64-67, 99-105, 108-112, 126-135 and 142-154.

The susceptibility of TMVcp to proteasomal cleavage was assessed using the IEDB algorithm defined by Nielsen, Lundegaard et al. (2005) and the Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavage, which uses two different prediction algorithms for proteasomal and immunoproteasomal cleavages (305). Several regions yielded high scores with these methods, indicating presence of sites that were potentially available for cleavage. Figure 5 shows the proteasomal cleavage predictions for the IEDB and PProC algorithms (NN and SVM, respectively).

The TAP binding affinity was assessed with the IEDB (306) and TAP Hunter (307) algorithms. As shown in Figure 6, several regions were found to be suitable for binding. The regions that had high values but did not correlate with the predicted proteasomal cleavage sites and with our experimental results were not

considered. The IEDB method revealed a similar landscape to that of quantification in the membrane and identified two peaks that correlated with our experimental findings. Amino acid residues 20-35, 47-58, 77-84 and 94-104 had the highest scores and were possibly associated with the TAP transporter; these regions were also identified in epitope mapping. The TAP Hunter prediction algorithm also identified four broad regions of the sequence that were comparable to our experimental findings overlapped with the results from the IEDB prediction. The regions identified by these methods must also have high binding affinities for MHC class I receptors in order to be efficiently exposed outside normal cells.

Figure 7 shows the results for the analysis of alleles Dd, Kd and Ld using the IEDB database for MHC class I of Balb/c mice. These results reflect the peptide affinity for the MHC complex based on the database predictions. The affinity of a given peptide for the complex was proportional to the corresponding score. All three predictions identified a region spanning residues 3 to 16 as having high affinity. The affinity of the region that included residues 60 to 90 varied among the three predictions but was higher than for the fragment before it. The scores for alleles Dd and Kd in this region were similar whereas that for allele Ld was lower, with all three alleles showing different binding affinities in this region. The highest score for the H2Dd prediction (82-89) was -0.4 compared to -0.2 for the Kd region of residues 71-77 and -0.03 for the Ld prediction the region of residues 79-86. Of the three alleles only Ld was able to bind peptides in the region spanning residues 103-110. The terminal regions of TMVcp had similar binding regions although there was a progressive decrease in the binding affinities of alleles Dd, Kd and Ld. The

greatest differences in the TMVcp peptide affinity scores were seen with alleles H2-Kd and H2-Ld. H2-Dd had low scores when compared to the other alleles and did not match the higher binding scores when the results from the three methods were combined with the overall scores (figure 8).

The MHC class II epitope predictions provided by the IEDB and CBS/Expasy servers were used to analyze the possible responses of macrophages and dendritic cells to a challenge with TMVcp. Figure 9 shows the results for the prediction of the two alleles IAd and IEd in Balb/c mice. The IAd allele recognized four long regions as possible binders to the MHC class II encoded by it; these regions were also detected in our experiments with TMVcp-immunized Balb/c mice, indicating that they were important in macrophage and T and B lymphocyte interactions and modulation. The MHC class II binding canyon allows the interaction of long peptides, even full proteins, provided that the 9-15 amino acid size limit is respected (282); (283). Interaction between antigen processing cells (APC) and T lymphocytes leads to rapid cell proliferation and cell signaling as part of the immune response. The subsequent T CD4 and B cell communication that modulates antibody production and memory follows strict rules (284, 285), and the end result is the binding of the endosome-lysosome-processed protein to the MHC class II complex, via CLIP. As shown here, the theoretical predictions and the experimental data yielded coherent results for the binding of IgG to epitopes on the membrane and high scores for the corresponding regions in IAd allele prediction. These findings suggest that there is a difference in the binding

affinities of the IAd and IEd alleles in two regions (residues 30-70 and 105-115) that needs further investigation.

The BEpiPred online software identified six regions with positive values that corresponded to positive predictions (Figure 10). Some of these regions were also detected by the spot technique, e.g., regions formed by residues 50-75, 100-115 and 140-155. This method found linear epitopes based on the TMVcp protein sequence. Based on the scores provided by this method, the first sequence of eight residues (3-10; SITTPSQF) corresponded to the first and second spots of the first line; the second linear epitope had 24 residues (89-112; TRNRIIEVENQANPTTAETLDATR) that corresponded to spots 2-9 of the second line, although experimentally only spots 5-9 were detected (Figure 1B). The third linear epitope had 12 residues (146-157; SSGLVWTSSPA) and corresponded to spots 22-25 spots, of which only spots 22-24 were detected experimentally.

The TMVcp sequence was subsequently mapped for discontinuous epitopes using the EpiPred and IEDB algorithms, with the crystal structure of TMVcp being used as the input. Figure 11 shows front (left) and rear (right) views colored according to the predictions (BepiPred) (panel A) or shown in yellow on the structure predicted by IEDB (panel B). Both methods yielded similar results. Eight residues (7, 37, 39, 43, 47, 50, 134, 147) had single interaction points and three regions (63-66, 90-106, 140-143) were also predicted to be discontinuous.

## **Discussion**

There is extensive structural information for TMV, particularly the capsid protein TMVcp. In this study, we used spot synthesis technology to map the epitopes of TMVcp that interact with B and T cells. The structural properties of TMVcp predicted by bioinformatics were also used to support our experimental results.

The literature provides in-depth information about the antigenic profile of the TMV coat protein. Several authors mapped the purified protein to identify which epitopes are recognized, in different animal models (87, 91, 103, 308, 309).

In our experiments we did not find significant binding in the first 42 peptides of the TMVcp, in contrast to previous results for the first ten peptides (308) and for peptides 19 – 32 (103) using polyclonal sera. Our results agreed with the literature for the positive regions found in our experiment. The regions described as positive are 34 - 39 (308), 55 – 61 (310) and 62 – 68 (309). Our results detected binding in the region 31 to 60, with the strongest binding located at regions 34 to 51 and 43 to 60. The region located at peptides 58 through 81 is also described as positive and by polyclonal sera (region 55 to 61 and 62 to 68). Positions found by both poly and monoclonal antibodies (MAbs) in the literature corresponds to regions from peptide 80 to 90, 105 to 112, 115 to 134, 134 to 146 and 153 to 156 (88, 90, 104). Our results showed positive binding for the region 85 to 108 with the strongest signal in residues 88 to 102 (spot 30). We did not find binding in the region from residues 97 to 132, in contrast with previous results (88, 289) but concur with other reports (90,

104) for the regions within residues 121 to 144 (spots 41 and 42) and 133 to 159 (spots 45 to 49).

Concerning the model used to investigate the antigenic profile of TMV, Anderer used tryptic peptides and an ELISA-fixed complement detection system with polyclonal and monoclonal antibodies (90). The work from Al Moudallal et al. used sera from immunized chicken and MAbs (104), and Altschuh and Van Regenmortel verified the problem in mapping the epitopes on a protein by means of MAbs (310). Other reports confirmed later on that longer proteins should be used in order to correctly address the antigen presentation process (98, 102, 311). The spot technique allows for this to be done and restricting the experiment to a mouse model along with epitope predictions specifically for this animal model provides a fast and accurate epitope mapping strategy.

The antigenic determinants of proteins are generally located in exposed polar, hydrophilic regions. Consequently, the accessibility and flexibility of these segments are greater than those of other potential epitopes located deeper in the three-dimensional structure of the molecule. As shown here, a Kyte-Doolittle plot of the TMVcp sequence revealed that the regions involving amino acid residues 30-78, 80-120 and 130-150 had negative values (Figure 3). These regions corresponded to the epitopes with higher binding intensities identified in the prediction analyses. Similar results have been described elsewhere using different, less accurate methods and animal models (30, 87, 98, 286).

Several studies have demonstrated a correlation between experimental data and bioinformatics prediction results for complex processes such as proteasomal cleavage, TAP binding affinity and MHC binding (228, 244, 293, 304, 312-314). A similar correlation was also observed here for the binding of TMVcp-derived peptides to MHC Class I and Class II in mice. Since TMV does not replicate in mice it is unlikely that mechanisms other than the usual intracellular antigen processing pathway were activated, i.e., there was probably no activation of antigen processing cells (APC) such as macrophages and dendritic cells that express only MHC class II epitope binding sites. In this context, the proteasome/TAP/MHC I predictions in the present study were done only for comparison since no mouse cells express receptors for TMVcp, although dendritic cells undergo autophagy and express both classes of MHC (163, 315, 316). The Balb/c alleles studied here were chosen from the IEDB site. A number of studies have shown the effect of amino acid replacements on protein function, e.g., the effect of mutations on the activity of influenza A polymerase (317, 318). Modification of capsid proteins may lead to a defective virus and consequently to an inability to assemble the virion particle, thereby hindering new infections (319, 320). We did not examine the functional domains of TMVcp since the ExPaSy functional domain prediction software did not find any additional functional domains in the TMV amino acid sequence used as the query sequence.

Hydrophobicity, flexibility, accessibility, the presence of turns, an exposed surface, polarity and antigenic propensity were parameters used to predict B cell epitopes. In general, turns occur on the surface of proteins and are generally

accessible and hydrophilic. In contrast, the core is mostly devoid of water molecules (237). In the case of herpes simplex virus type I VP5 capsid protein the secondary structure is important for antibody binding and even a minor modification can affect antigen identification by the immune system (321, 322). TMVcp has at least three major hydrophilic regions that span residues 30-70, 90-120 and 140-150; all three regions were also found to have higher binding capacities.

Based on the cutoff used for the binding of mouse IgG to the membrane the TMVcp epitopes were found to be located in residues 31-60, 85 - 108 and 133 - 159. The IEDB tools showed that these regions had a higher probability of proteasomal cleavage. These results were complemented by the predictions of TAP-binding affinity. The predictions of binding to MHC class I took into account the combined results of the three prediction methods and the alleles used for this approach were based on the Balb/c immunological profile, which includes only three MHC alleles (Dd, Kd and Ld) available from the IEDB and CBS servers. The variation in the predicted binding observed with this method probably reflected structural differences in the MHCs that influenced MHC-peptide interactions (323). In this context, *in silicio* analysis revealed different possible bindings for each allele tested and the detection of antibody binding to those were experimentally confirmed (Figures 1, 2 and 7). In general, the CBS server analyzed residues individually whereas the IEDB used 9-mers in its analysis of each allele in the three major antigenic regions identified experimentally.



These three antigenic regions were also evaluated with the IDEB and CBS servers using MHC class II prediction software. The regions predicted to show high affinity binding were also found to be positive in the spot synthesis. Peptides derived from the segment containing residues 37-69 had lower IC<sub>50</sub> scores by the SMM method in allele IAd whereas for allele IEd the lowest scores were observed with the longest segments. In the latter case, the peptides were derived from a segment containing residues 34-85. These findings suggest that these regions are not only immunogenic and must be further investigated. However, we could not confirm it experimentally at this time. When comparing the binding affinities of the restricted alleles for MHC class I and class II receptors one can find that the regions predicted to be of high affinity were different among the predictions.

The B cell prediction software found this region to be of great importance, with the highest values being found for residues 46-66, in agreement with our experimental results. The discontinuous B cell epitope prediction found this same region to be important and longer (stretching from residue 33 to 90), with two peaks being predicted within this region. These two peaks are separated only by a few residues (61-63), which markedly decreased the binding probability according to the algorithm used. The identification of these residues agreed with the theory governing their prediction.

B cells are of particular interest because their surface receptors are formed by rearrangement mediated by IgGs. Consequently, positive epitopes recognized by mouse IgGs and possibly presented via MHC II may be associated with B cell

predictions through crosstalk with APCs. This possibility was examined by using several B epitope prediction engines, the results of which are shown in Figure 8. The parameters mentioned above were correlated to the location of continuous epitopes. As a result, five TMVcp regions were predicted to be B-cell epitopes. The shortest epitope was the first in the sequence and spanned residues 18-20 while the longest one was the second and spanned residues 52-64. The IAd and IEd alleles were chosen for this analysis. Peptides below the  $IC_{50}$  cutoff, i.e., those with the best predicted binding affinities, are shown in Figure 9.

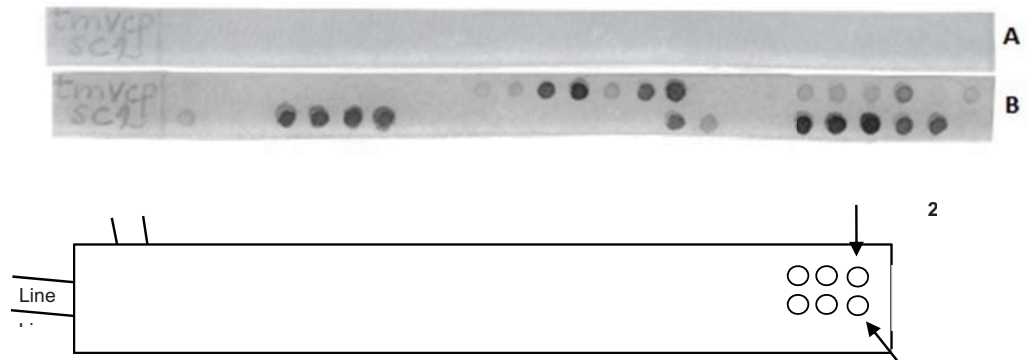
The results described here agree with other reports for this virus and data from reference centers on TMV studies support our spot synthesis results; however, the epitopes that we identified differed from those reported in these other studies. In Balb/c mice, the inoculation of TMV the first ten overlapping pentadecapeptides of TMVcp did not produce marked signs of antibody response (Figures 1 and 2). Van Regenmortel and cols (1999) reported that these regions are important epitopes. However, the use of several different models to obtain the results described by these authors could have led to different immune responses against the same antigen (as shown for MHC class I alleles in Balb/c mice) thereby making it difficult to interpret their findings.

In conclusion, the findings reported expand the epitope mapping of the TMVcp on mice models. We found discordant regions first regarded as well-defined epitopes that did not bind antibodies in the present study, suggesting a more careful exploration of different antigen processing machineries of the animal

models chosen. Using prediction algorithms for comparison the results produced were in agreement with the experimental data. Epitope mapping is an effective tool for measuring and identifying which regions from a given protein binds effectively any antibody response and if used together with *in silicio* predictions should provide a powerful instrument for deciding best options for epitope-based vaccine design, which can be confirmed thoroughly and further assessment of those decisions. Future studies should assess the extent to which the exposure of different protein surfaces in mutant TMVcp can elicit different immune responses.

#### Acknowledgements

The authors thank Ronald Frank and Susanne Daenicke from Helmholtz Centre for Infection Research in Braunschweig, Germany, for generous preparation of the peptide SPOT array, Ricardo Aparicio from Institute of Chemistry, Unicamp, for helpful discussions about TMV structure, and Stephen Hyslop for editing the English of the manuscript. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.



**Figure 1: Peptide reactivity of serum from mice immunized with porcine parvovirus (A, negative control) compared with serum from mice immunized with native TMV (B). Peptides were generated from the TMVcp sequence by spot synthesis on cellulose membranes. After incubation with sera the membranes were scanned and digitalized for spot quantification. (C) Scheme of peptide localizations on the membrane. The corresponding pentadecaptides are shown in Figure 2.**

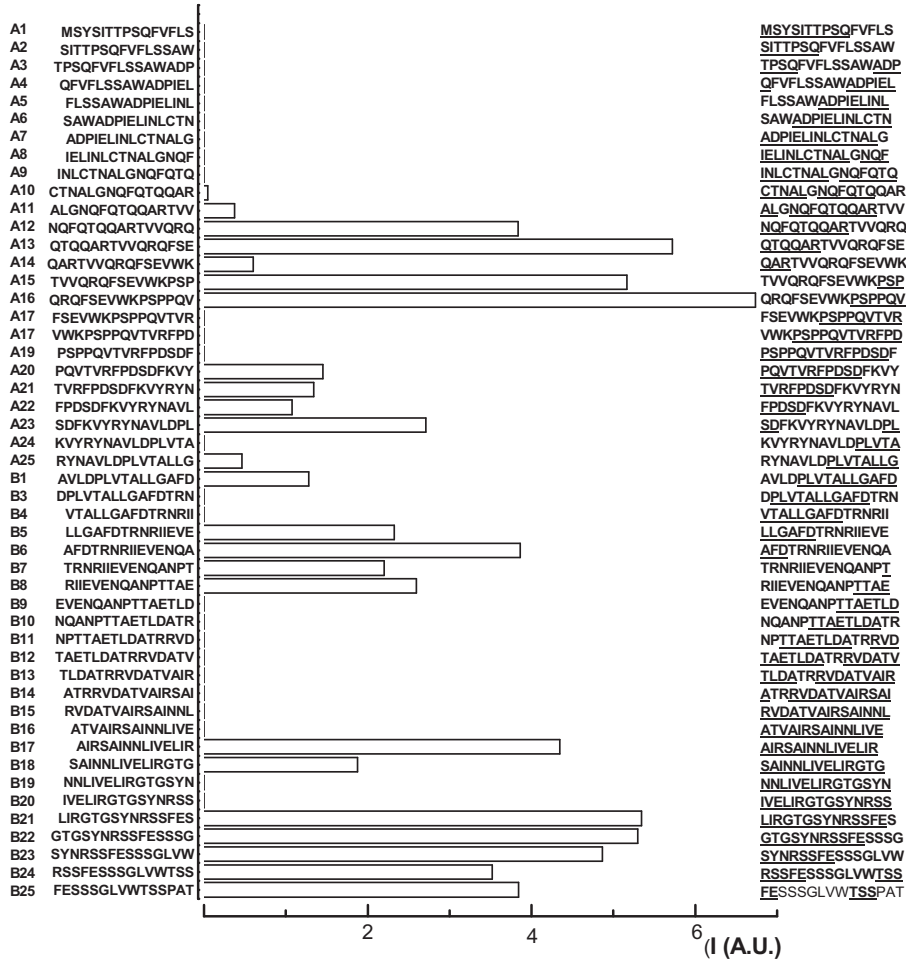
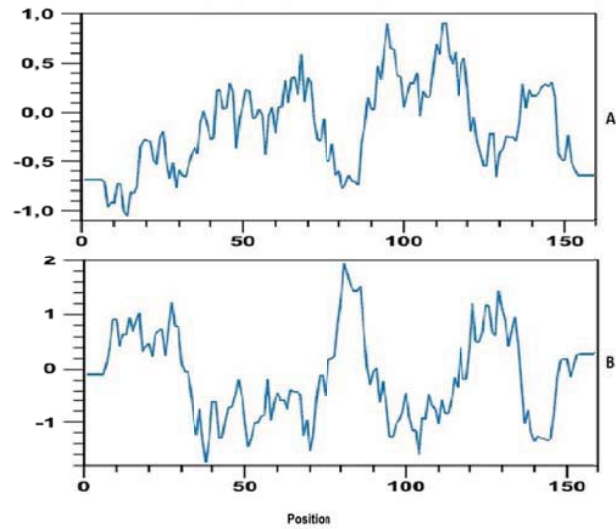
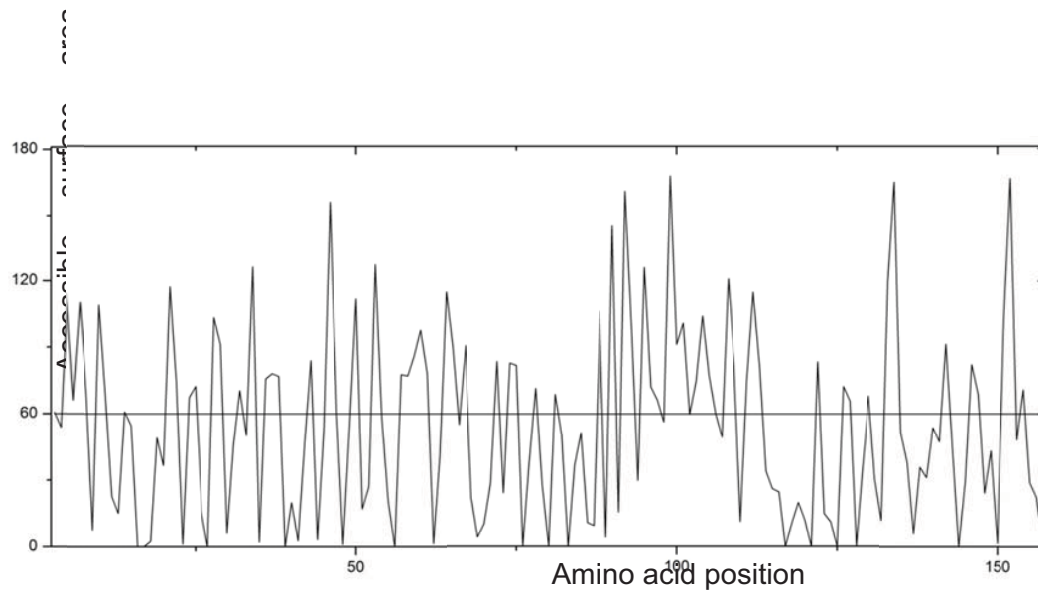


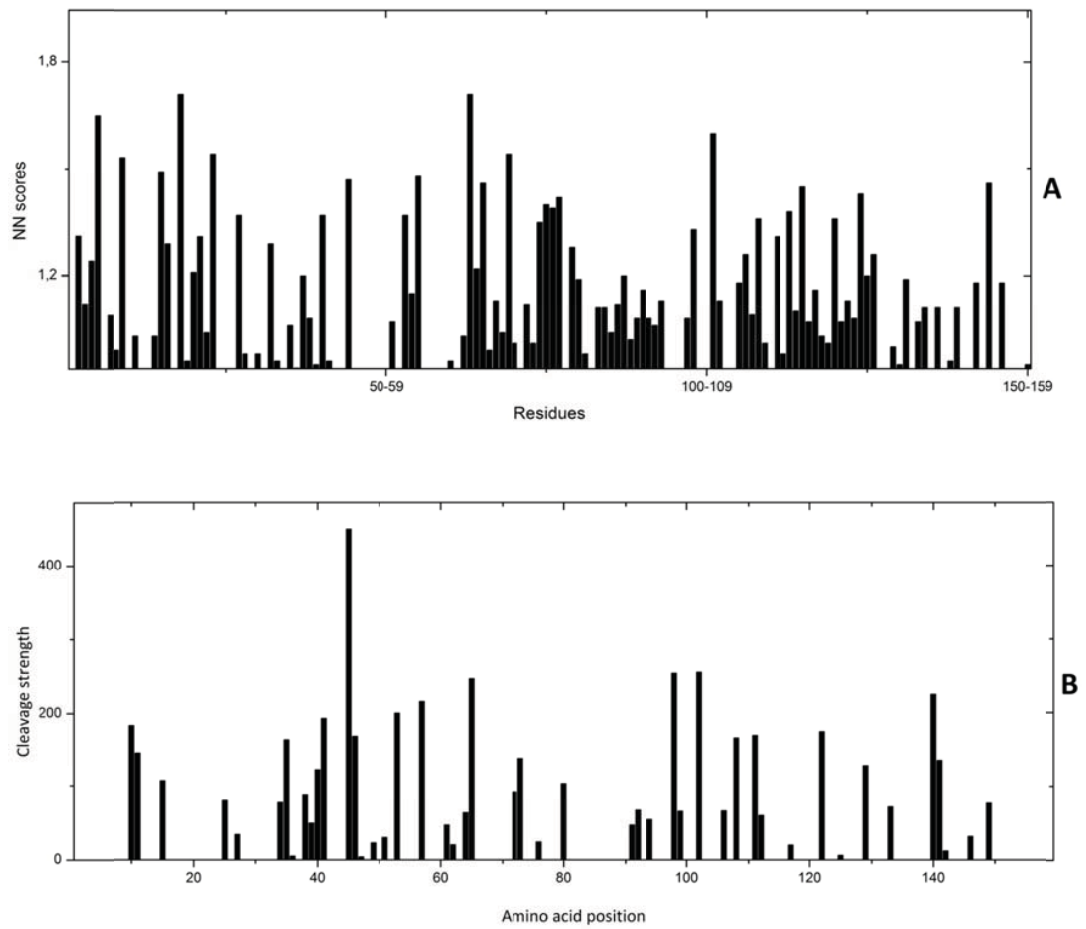
Figure 2: Epitope mapping results based on Figure 1, expressed as spot intensity in A. U. (arbitrary units) . The length of the columns reflects the extent of immunoreactivity (spot intensity, as quantified with TotalLab Quant Software and corrected for the control). The corresponding pentadecapeptides are listed on the left and right. The underlined amino acids on the right indicate epitopes identified in previous reports (30, 87, 286).



**Figure 1: A – Antigenicity plot generated with the Hopp-Woods algorithm. This plot identifies polar and apolar regions within the TMVcp sequence (apolar regions have negative values). B – Hydrophobicity plot generated with the Kyte-Doolittle algorithm. Regions with positive values are hydrophobic.**

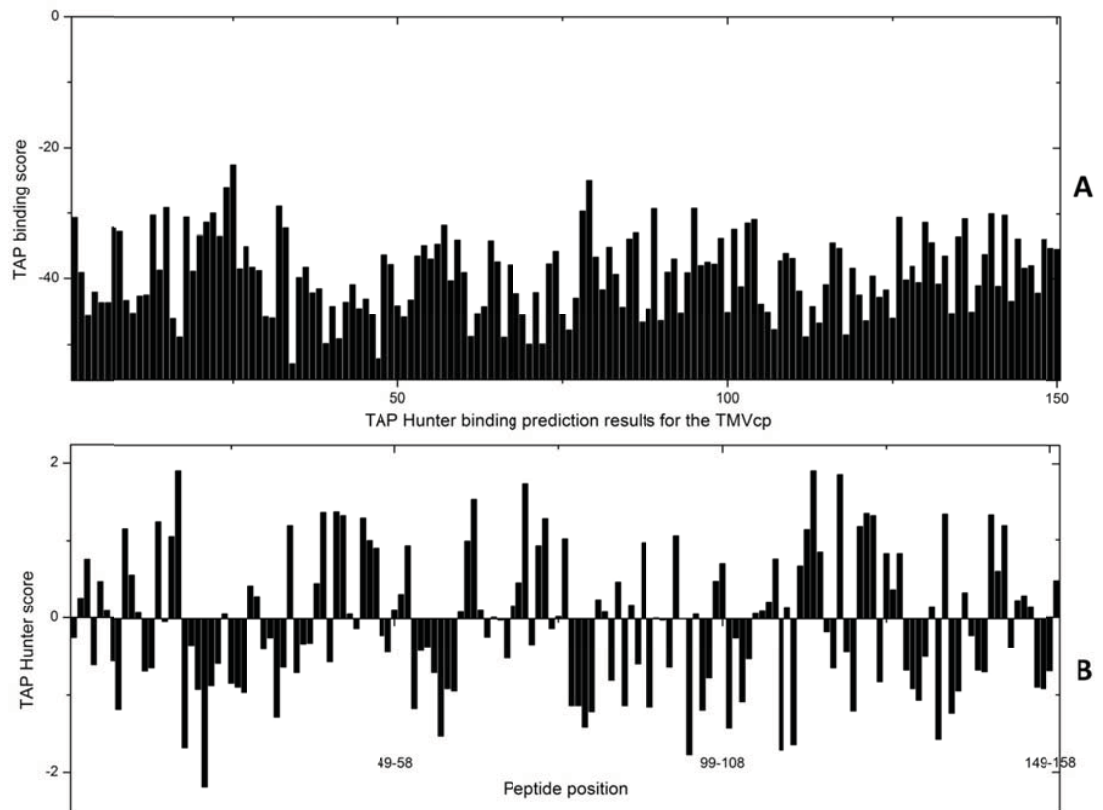


**Figure 2: Solvent accessible surface area scores for TMVcp. Scores above the threshold of 60 indicates residues exposed on the surface of the protein.**

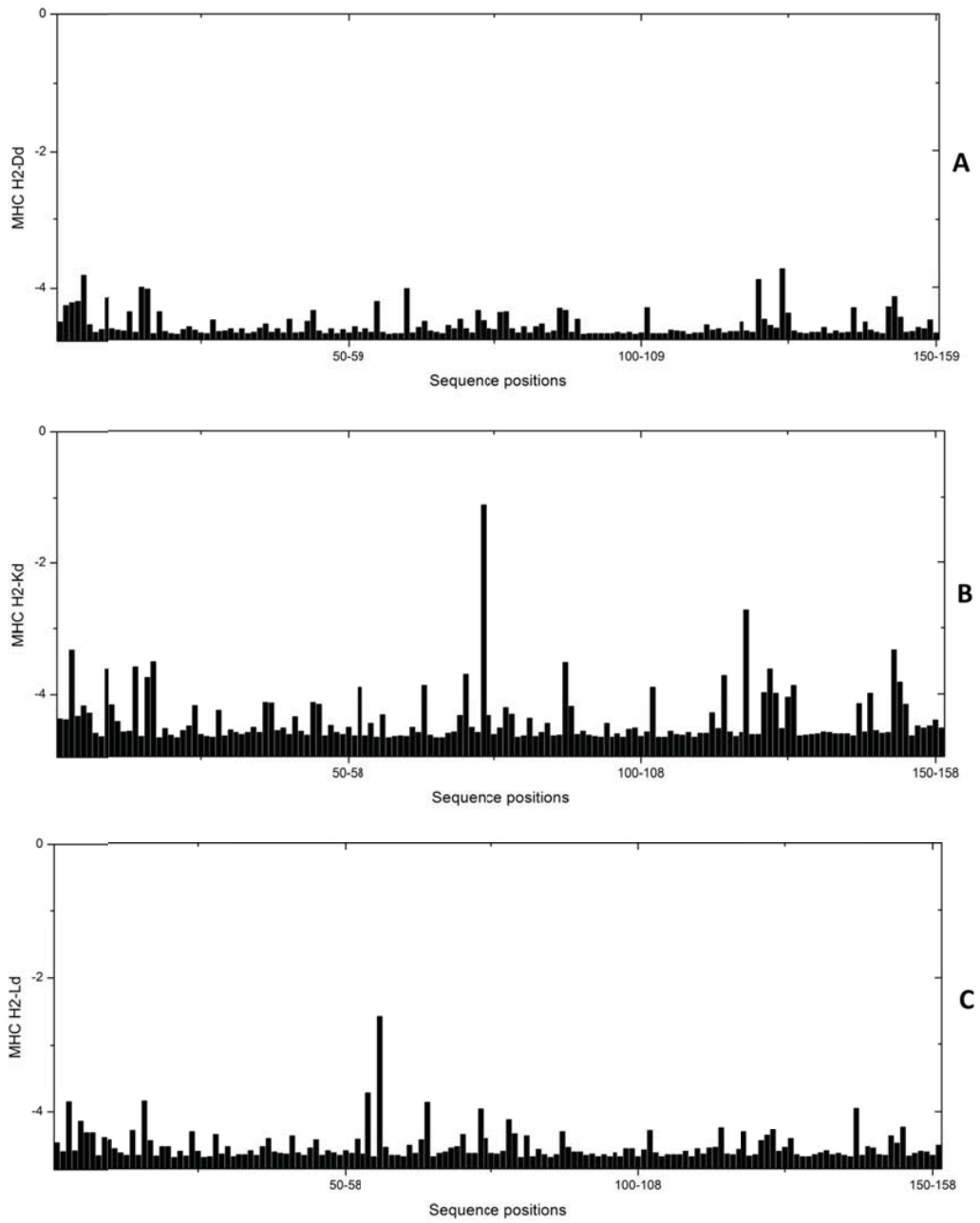


**Figure 5: Predicted proteasomal cleavage of TMVcp based on the IEDB (A) and PProC (B) algorithms. In (A), the X axis represents the TMVcp sequence divided into decapeptides (segments of 10 peptides each) (324). In (B), the X axis shows the amino acid position in TMVcp. In this case, a greater cleavage strength indicates a higher probability of cleavage by the proteasome complex (305). IEDB = Proteasome Cleavage Prediction by Neural Network. PProC = Proteasome Cleavage Prediction (human wild type I).**



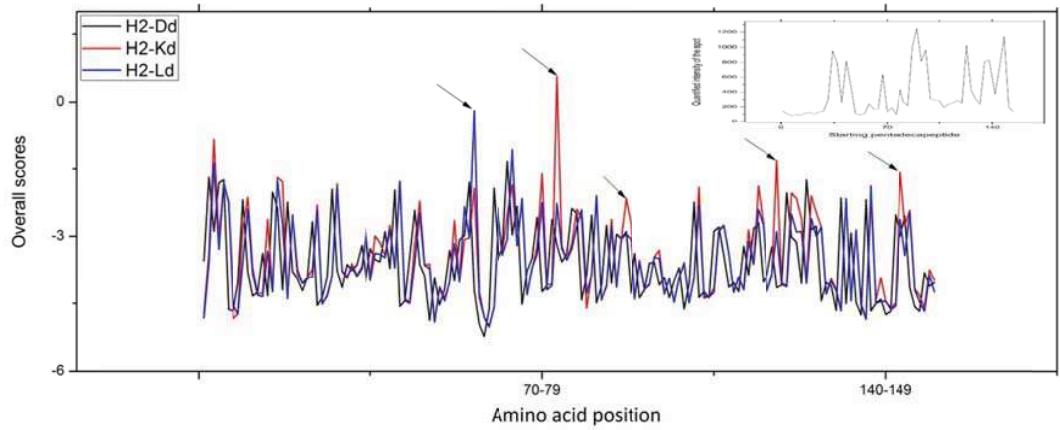


**Figure 6: TAP-binding regions of TMVcp predicted using (A) Support Vector Machine TAP (IEDB algorithm) and (B) TAP Hunter. In (A), scores  $>-40$  indicate possible binding sequences (306). In (B), positive values indicate possible TAP binding. The TAP Hunter algorithm identified several regions with low probability scores (325).**

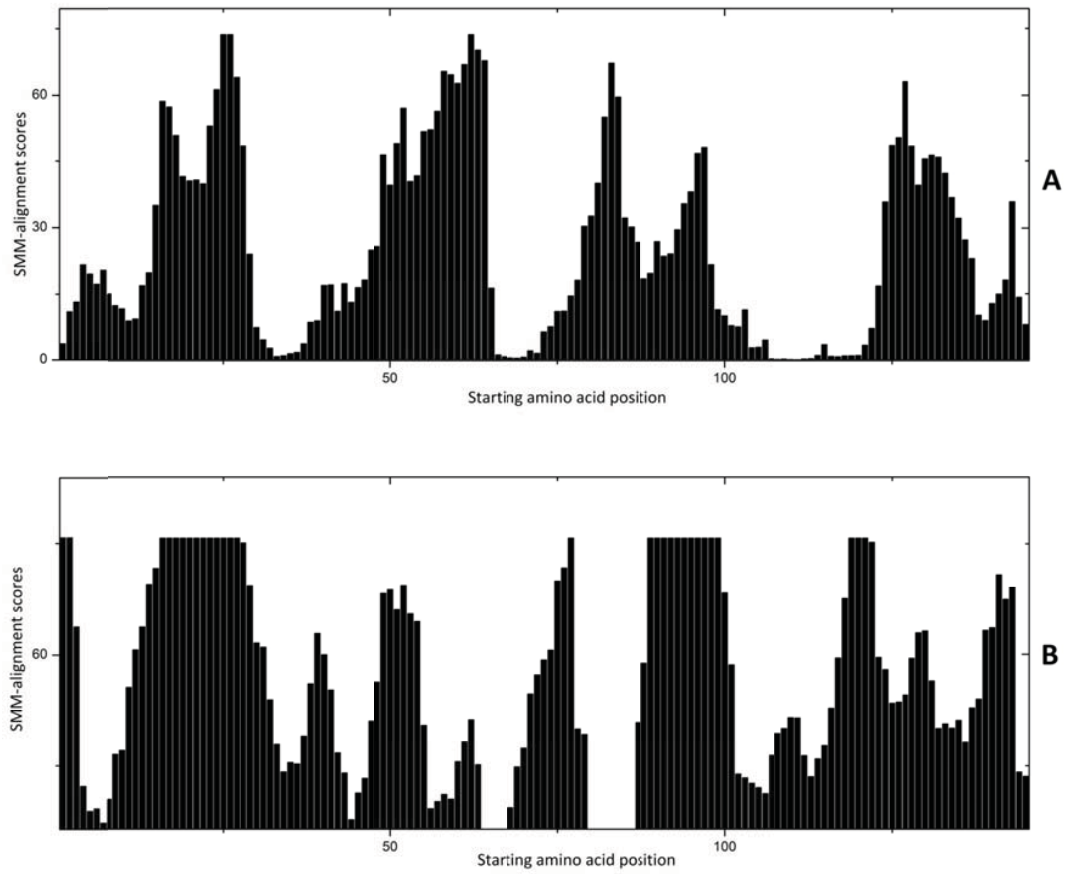


**Figure 7: MHC class I predictions for TMVcp. A, B and C – MHC predictions for Balb/c mice alleles H2-Dd, H2-Kd and H2-Ld, respectively. Higher scores indicate sequence-specific affinity for the allele coded MHC.**

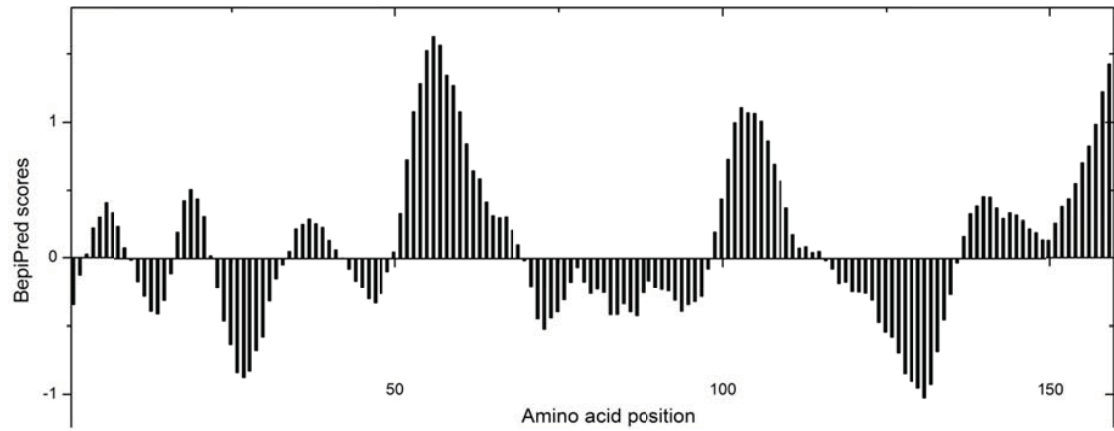




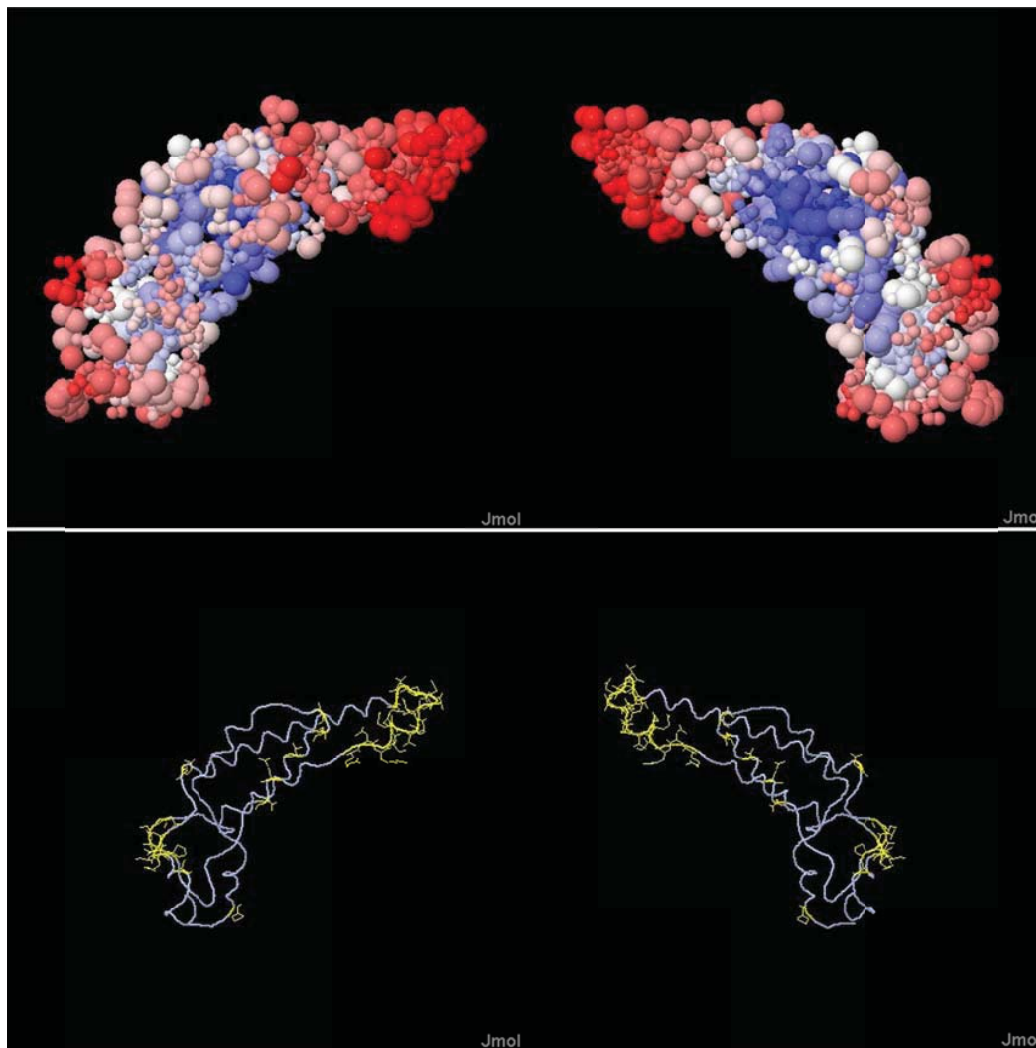
**Figure 8: Combined overall results for the three Balb/c MHC class I alleles. Arrows indicate epitopes that were identified experimentally and predicted by bioinformatics tools (267). Inset: Spot intensities quantified by densitometric analysis of the spot synthesis membrane.**



**Figure 9: Identification of the TMVcp regions capable of binding to MHC class II epitopes (243). The binding affinities of TMVcp pentadecapeptides to mouse MHC class II were predicted based on SMM alignments for alleles H2-IAd (A) and H2-IEd (B). In both panels, the higher the score the greater the affinity of the pentadecapeptide for MHC class II.**



**Figure 3: BepiPred scores for prediction interactions between TMVcp and B cell epitopes. Positive scores correspond to predicted epitopes.**



**Figure 4: BepiPRED and IEDB B cell discontinuous epitope predictions for the Protein Data Bank (PDB) file 3J06 A chain. BepiPRED-predicted epitopes on TMVcp are indicated in color (blue: low binding probability; red: high binding probability).**

## Bibliography

1. Rappaport I, Siegel A, Haselkorn R (1965) Influence of the State of Subunit Aggregation on the Antigenic Specificity of Tmv and Tymv. *Virology* 25: 325-328.
2. Rappaport I (1965) The antigenic structure of tobacco mosaic virus. *Adv Virus Res* 11: 223-275.
3. Van Regenmortel MH (1999) The antigenicity of tobacco mosaic virus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 354: 559-568.
4. Van Regenmortel MH, Altschuh D, Klug A (1986) Influence of local structure on the location of antigenic determinants in tobacco mosaic virus protein. *Ciba Foundation symposium* 119: 76-92.
5. Klug A (1999) The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 354: 531-535.
6. Bonafe CF, Vital CM, Telles RC, Goncalves MC, Matsuura MS, et al. (1998) Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochemistry* 37: 11097-11105.
7. Santos JL, Bispo JA, Landini GF, Bonafe CF (2004) Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure. *Biophysical chemistry* 111: 53-61.
8. Santos JL, Aparicio R, Joekes I, Silva JL, Bispo JA, et al. (2008) Different urea stoichiometries between the dissociation and denaturation of tobacco mosaic virus as probed by hydrostatic pressure. *Biophysical chemistry* 134: 214-224.
9. Morrow PR, Rennick DM, Leung CY, Benjamini E (1984) The antibody response to a single antigenic determinant of the tobacco mosaic virus protein: analysis using monoclonal antibodies, mutant proteins and synthetic peptides. *Molecular immunology* 21: 301-309.
10. Altschuh D, Al Moudallal Z, Briand JP, Van Regenmortel MH (1985) Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--VI. Attempts to localize viral epitopes with monoclonal antibodies. *Molecular immunology* 22: 329-337.
11. Petrovsky N, Silva D, Brusica V (2003) The future for computational modelling and prediction systems in clinical immunology. *Novartis Foundation symposium* 254: 23-32; discussion 33-42, 98-101, 250-102.



12. Kim Y, Sette A, Peters B (2011) Applications for T-cell epitope queries and tools in the Immune Epitope Database and Analysis Resource. *Journal of immunological methods* 374: 62-69.
13. Roomp K, Antes I, Lengauer T (2010) Predicting MHC class I epitopes in large datasets. *BMC bioinformatics* 11: 90.
14. Frank R, Overwin H (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* 66: 149-169.
15. Beutling U, Stading K, Stradal T, Frank R (2008) Large-scale analysis of protein-protein interactions using cellulose-bound peptide arrays. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 110: 115-152.
16. Soutullo A, Santi MN, Perin JC, Beltramini LM, Borel IM, et al. (2007) Systematic epitope analysis of the p26 EIAV core protein. *Journal of molecular recognition : JMR* 20: 227-237.
17. Karplus PA, Schulz, G.E. (1985) Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens. *Naturwissenschaften* 72: 2.
18. Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters* 276: 172-174.
19. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* 157: 105-132.
20. Hopp TP, Woods KR (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 3824-3828.
21. Diez-Rivero CM, Chenlo B, Zuluaga P, Reche PA (2010) Quantitative modeling of peptide binding to TAP using support vector machine. *Proteins* 78: 63-72.
22. Emmerich NP, Nussbaum AK, Stevanovic S, Priemer M, Toes RE, et al. (2000) The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *The Journal of biological chemistry* 275: 21140-21148.
23. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, et al. (2001) Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *The Journal of experimental medicine* 194: 1-12.
24. Tenzer S, Stoltze L, Schonfisch B, Dengjel J, Muller M, et al. (2004) Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and

immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. *J Immunol* 172: 1083-1091.

25. Bhasin M, Lata S, Raghava GP (2007) TAPPred prediction of TAP-binding peptides in antigens. *Methods Mol Biol* 409: 381-386.
26. Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MH (1991) Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. *Methods in enzymology* 203: 176-201.
27. Daniel S, Brusica V, Caillat-Zucman S, Petrovsky N, Harrison L, et al. (1998) Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J Immunol* 161: 617-624.
28. Garcia-Boronat M, Diez-Rivero CM, Reinherz EL, Reche PA (2008) PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic acids research* 36: W35-41.
29. Wingfield PT, Stahl SJ, Thomsen DR, Homa FL, Booy FP, et al. (1997) Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus. *Journal of virology* 71: 8955-8961.
30. Warren RL, Holt RA (2010) A census of predicted mutational epitopes suitable for immunologic cancer control. *Hum Immunol* 71: 245-254.
31. Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, et al. (2008) Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic acids research* 36: W513-518.
32. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, et al. (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic acids research* 36: W509-512.
33. Karpova O, Nikitin N, Chirkov S, Trifonova E, Sheveleva A, et al. (2012) Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *The Journal of general virology* 93: 400-407.
34. Nussbaum AK, Kuttler C, Hadelers KP, Rammensee HG, Schild H (2001) PAPProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* 53: 87-94.
35. Peters B, Bulik S, Tampe R, Van Endert PM, Holzhutter HG (2003) Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J Immunol* 171: 1741-1749.

36. Zhang GL, Petrovsky N, Kwok CK, August JT, Brusic V (2006) PRED(TAP): a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing. *Immunome research* 2: 3.
37. Sette A, Adorini L, Colon SM, Buus S, Grey HM (1989) Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J Immunol* 143: 1265-1267.
38. Stern LJ, Wiley DC (1994) Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Institute Mitteilungen*: 1-10.
39. Borghesi L, Milcarek C (2006) From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunologic research* 36: 27-32.
40. Santos P, Arumemi F, Park KS, Borghesi L, Milcarek C (2011) Transcriptional and epigenetic regulation of B cell development. *Immunologic research* 50: 105-112.
41. Altschuh D, Hartman D, Reinbolt J, Van Regenmortel MH (1983) Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--V. Localization of four epitopes in the protein subunit by inhibition tests with synthetic peptides and cleavage peptides from three strains. *Molecular immunology* 20: 271-278.
42. Al Moudallal Z, Briand JP, Van Regenmortel MH (1982) Monoclonal antibodies as probes of the antigenic structure of tobacco mosaic virus. *The EMBO journal* 1: 1005-1010.
43. De LMRC, van Regenmortel MH (1979) Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--III. Demonstration of five antigenic regions in the protein subunit. *Molecular immunology* 16: 179-184.
44. Anderer FA, Strobel G (1972) Recognition of conjugated and native peptide determinants. II. Enhancement of antibodies with sequential specificity in anti-TMV sera by preimmunization with conjugated peptide antigens. *European journal of immunology* 2: 278-282.
45. Altschuh D, Van Regenmortel MH (1982) Localization of antigenic determinants of a viral protein by inhibition of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with tryptic peptides. *Journal of immunological methods* 50: 99-108.
46. Al Moudallal Z, Altschuh D, Briand JP, Van Regenmortel MH (1984) Comparative sensitivity of different ELISA methods for detecting monoclonal antibodies to viruses. *Developments in biological standardization* 57: 35-40.
47. Benjamini E, Leung CY, Rennick DM (1978) Immunochemical studies on the tobacco mosaic virus protein. *Advances in experimental medicine and biology* 98: 165-179.

48. Anderer FA (1963) Recent Studies on the Structure of Tobacco Mosaic Virus. *Adv Protein Chem* 18: 1-35.
49. Dekker EL, Porta C, Van Regenmortel MH (1989) Limitations of different ELISA procedures for localizing epitopes in viral coat protein subunits. *Archives of virology* 105: 269-286.
50. Dore I, Altschuh D, Al Moudallal Z, Van Regenmortel MH (1987) Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--VII. Use of comparative surface accessibility of residues in antigenically related viruses for delineating epitopes recognized by monoclonal antibodies. *Molecular immunology* 24: 1351-1358.
51. Van Regenmortel MH, Altschuh D, Zeder-Lutz G (1993) Tobacco mosaic virus: a model antigen to study virus-antibody interactions. *Biochimie* 75: 731-739.
52. Van Regenmortel MHV (1996) Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods* 9: 465-472.
53. Tsurui H, Takahashi T (2007) Prediction of T-cell epitope. *Journal of pharmacological sciences* 105: 299-316.
54. Mohabatkar H (2007) Prediction of epitopes and structural properties of Iranian HPV-16 E6 by bioinformatics methods. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 8: 602-606.
55. Schuler MM, Nastke MD, Stevanovic S (2007) SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction. *Methods Mol Biol* 409: 75-93.
56. Lara J, Wohlhueter RM, Dimitrova Z, Khudyakov YE (2008) Artificial neural network for prediction of antigenic activity for a major conformational epitope in the hepatitis C virus NS3 protein. *Bioinformatics* 24: 1858-1864.
57. Lundegaard C, Lund O, Kesmir C, Brunak S, Nielsen M (2007) Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics* 23: 3265-3275.
58. Gruber A, Brocker T (2005) MHC class I-positive dendritic cells (DC) control CD8 T cell homeostasis in vivo: T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells. *J Immunol* 175: 201-206.
59. Chemali M, Radtke K, Desjardins M, English L (2011) Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68: 1533-1541.

60. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology* 11: 823-836.
61. Trifonov V, Racaniello V, Rabadan R (2009) The Contribution of the PB1-F2 Protein to the Fitness of Influenza A Viruses and its Recent Evolution in the 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic Virus. *PLoS currents* 1: RRN1006.
62. Ozawa M, Basnet S, Burley LM, Neumann G, Hatta M, et al. (2011) Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses. *Journal of virology* 85: 4596-4601.
63. Grattinger M, Hohenberg H, Thomas D, Wilk T, Muller B, et al. (1999) In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology* 257: 247-260.
64. Kuhlmann U, Sarkar S, Rohde W (1993) Capsid protein gene sequences of four tobacco mosaic virus strains defective for virus assembly. *Nucleic acids research* 21: 3325.
65. Schlosser G, Mezo G, Kiss R, Vass E, Majer Z, et al. (2003) Synthesis, solution structure analysis and antibody binding of cyclic epitope peptides from glycoprotein D of Herpes simplex virus type I. *Biophysical chemistry* 106: 155-171.
66. Homa FL, Brown JC (1997) Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Reviews in medical virology* 7: 107-122.
67. Grey HM, Ruppert J, Vitiello A, Sidney J, Kast WM, et al. (1995) Class I MHC-peptide interactions: structural requirements and functional implications. *Cancer surveys* 22: 37-49.
68. Kesmir C, Nussbaum AK, Schild H, Detours V, Brunak S (2002) Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein engineering* 15: 287-296.
69. Lam TH, Mamitsuka H, Ren EC, Tong JC (2010) TAP Hunter: a SVM-based system for predicting TAP ligands using local description of amino acid sequence. *Immunome research* 6 Suppl 1: S6.
70. Tenzer S, Peters B, Bulik S, Schoor O, Lemmel C, et al. (2005) Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 62: 1025-1037.

71. Nielsen M, Lundegaard C, Lund O (2007) Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. BMC bioinformatics 8: 238.

### 8.1.2 The effect of High Hydrostatic Pressure on Avian Metapneumovirus Immunogenicity

Lourdes Maria Araujo Quaresma de Camargo<sup>1</sup>, Daniel Ferreira de Lima Neto<sup>1</sup>, Carlos Francisco Sampaio Bonafe<sup>2</sup> and Clarice Weis Arns<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biologia, Universidade de Estadual Campinas, Campinas, SP, CEP 13083 970, Brazil*

<sup>2</sup>*Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil.*

#### Abstract

High hydrostatic pressure (HHP) induces virus inactivation due to structural changes on the virus. Since the virion is partially preserved, immunogenic properties can be preserved, so it is an interesting method for developing new vaccines. The present work goals were to access the HHP inactivation of avian

metapneumovirus (aMPV), an upper respiratory tract disease of turkeys and chickens, both in vitro and in vivo. We observed a time dependent inactivation of aMPV. The exposure at 250 MPa in 60 min reduced viral infectivity by 3 to 4 orders of magnitude in a pressure and time dependent manner. Results from the in vitro experiments were consistent with the in vivo results regarding antibody production and inactivation measurements. This work highlights the importance of the HHP method by comparing experimental results with other inactivation methods.

Key words: Avian Metapneumovirus, High Hydrostatic Pressure, Inactivation

## Introduction

The family Paramyxoviridae encompasses enveloped, negative-polarity, single stranded RNA of approximately 15 kb with embedded projections ranging from 13 to 15 nm (326). The genera Metapneumovirus, as defined in 2000 by Seal and colleagues (327), comprises viruses that infect humans causing mild respiratory infections to severe complications to the respiratory system (328, 329), but the genera is better known for its avian pathogens. Avian metapneumoviruses (aMPV) have been implicated in the upper respiratory tract disease of turkeys and chickens, which is known as turkey rhinotracheitis (330). The virus has also been associated with the swollen head syndrome (SHS) of chickens. As first described in South Africa in the late 1970s (331), avian metapneumovirus soon appeared in Europe and the Middle East (332). The disease has now been reported in all the major poultry-producing areas in the world except for Australasia. The avian

metapneumoviruses are divided into three well-defined subgroups (A, B, and C), with enormous impacts in avian culture as reviewed by several authors (326, 330, 333, 334), economic losses and health risk issues are the main concerns related to this pathogen. Their genomes encode for 10 separate genes, and, among these products, there are at least three immunogenic proteins, the fusion protein F, attachment protein G and the small hydrophobic protein SH (335).

The use of high hydrostatic pressure (HHP) makes it possible to control the dissociation of viruses, oligomeric proteins and other subcellular assemblies (208). For many oligomers, there is a substantial hysteresis between their compression and decompression dissociation curves, suggesting the formation of a defective re-associated form that relaxes slowly to its native conformation (210). For multisubunit protein systems such as viruses, reassembly becomes even more difficult and, in some cases, stable but defective assemblages are formed (48, 208, 210).

HHP can have a disruptive effect on living organisms by either destroying or inactivating microbial cells through a combination of physiological and biochemical effects on the microorganisms, as demonstrated by studies from our group (48, 208, 210, 336). Currently, several viruses have been investigated to better understand their observed inactivation mechanisms and to determine a way to control the spread of viruses in a more effective way (337-339). The results from



these studies are promising. After being exposition to higher pressures, viral titer reductions was common and immunogenic particles were formed (202, 214, 339)

Pressure selectively alters the properties of molecules and complex biological systems by breaking non-covalent associations while the covalent structures of individual molecules are maintained intact. This feature generates interest in the use of pressure for the production of viral vaccines. The precise relationship of capsid proteins with each other, the lipid membrane, when there is one, and nucleic acids should be responsible for specific infectivities, while an intact covalent structure of proteins is necessary for immunity (338, 340-345)

Therefore, for to better understand the inactivation mechanism of high hydrostatic pressure and its influence on the immunological determinants of avian metapneumovirus, the present research was performed.

## Materials and methods

### *Virus samples and cell lines*

A chicken embryo-related (CER) cell line and tracheal ring primary cultures were maintained in Modified Eagle Medium (MEM) supplemented with 10% bovine fetal serum for 48 h in 5% CO<sub>2</sub> partial pressure (37 °C) at an inicial concentration of  $5 \times 10^5$  cells/ml. The aMPV sample utilized is a Brazilian isolate known as the Swollen Head Syndrome strain 119-BR (SHS-119-BR), which was isolated and

identified by our laboratory (346, 347) maintained in primary cultures of tracheal rings and then in a CER cell line.

#### *Antigen production*

A viral sample was absorbed to the monolayers of confluent CER monolayers in a 100 TCID<sub>50</sub>/ml dilution and incubated for one hour at 37 °C for viral adsorption. The cells were then washed with PBS and replenished with maintenance medium (MEM supplemented with 1% FBS). Upon evidence of cytopathic effects, supernatants were collected and titrated using the improved method of Reed and Muench (348). Samples were frozen at -80 °C.

#### *In vitro high hydrostatic pressure effect on aMPV samples*

##### *Equipment*

Briefly, a special steel alloy pump with three quartz optical windows was used. Pressure was generated by a piston that pumps ethanol through the metallic ducts. The piston was manually operated, and an analog manometer was used to read the generated pressure.

#### *Effect of increased hydrostatic pressure on aMPV infectivity*

Inside a laminar flow chamber, 2 mL of a  $2 \times 10^5$  viral particle solution was used. It was placed in a sterilized quartz cuvette, sealed with a modified sterile polyethylene tube heated on one extremity and then pressurized. Each sample was prepared individually prior to taking readings. Previously titrated aMPV samples were exposed to different pressures over 60 min and titrated again under atmospheric pressure. A sample that was not submitted to high-pressure treatment was used as a control. Every pressure point was performed in triplicate. Procedures were made as described previously (336).

#### Effect of higher exposure time points at 250 MPa on aMPV infectivity

Viral samples containing 1 mL of a  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml were exposed to a fixed pressure point of 250 MPa through eight different time points (20, 30, 60, 80, 90, 100, 120 and 150 min) at 27 °C. For each time point, a separate cuvette was prepared, and, after the pressure exposure, the viral sample was brought to atmospheric pressure and titrated. Each time point was performed in triplicate, and the method was performed in triplicate.

#### *In vitro* beta-propiolactone (BPL) effect on aMPV infection

##### *Concentration dependence on aMPV infectivity*

A concentrated BPL solution (Sigma, St. Louis, USA) was diluted to final concentrations of 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025% and 0,02%, and aMPV samples were incubated for two hours with gentle agitation at 37 °C. Viral-BPL solutions were then kept at 4 °C to block BPL activity, and the solutions were titrated.

Partially inactivated viral-BPL solutions were previously prepared and used as positive controls. Negative controls consisted of BPL solutions and cells.

*Effect of a combined HP-BPL treatment on aMPV infectivity*

The inactivating effect of BPL treatment on aMPV was studied by examining a sample's chemical exposure in two different time points at 250 MPa. One sample mixed with BPL (prepared to a final concentration of 0.025%) was placed in a quartz cuvette, sealed and submitted to a pressure of 250 MPa for 20 and 30 min. Afterwards, the pressure was returned to nominal values and, alongside with a control sample not submitted to HP treatment, the samples were titrated, and the procedure was repeated.

*In vivo effect of HP treatment on aMPV immunogenicity*

All *in vivo* studies were conducted on white specific pathogen free (SPF) Leghorn chickens bred in the Laboratory of Uberlandia, Minas Gerais at the Federal University of Minas Gerais.

*Evaluation of the immune response of a HP-treated aMPV challenge in chickens*

One-day-old SPF chickens (20) were inoculated with a HP-inactivated aMPV sample (SHS119-BR), which is a procedure previously standardized at 120 min of exposure at 250 MPa with and without Freund's adjuvant (336). Sera from immunized chickens were used to determine the HP effect on aMPV's immunogenicity. Particle functionality was studied through immune response

pattern comparisons between birds inoculated with the SHS-119-BR reference strain and the HP treated sample. Another experiment to access antibody titers enrolled two-week-old chickens (40) that were divided into four groups. To determine the antibody titer against aMPV, blood samples were collected immediately before and thirty days after day one of the experiment. The birds were examined daily for observable changes. Group 1 birds were inoculated with HP-inactivated aMPV samples subcutaneously through the neck and intramuscularly in the thigh. A booster dose was performed 15 days after the first inoculation. Group 2 birds were inoculated with HP-inactivated aMPV dissolved in a mineral oil emulsion following the same procedure described for group 1. Group 3 birds were inoculated with an untreated aMPV sample, and group 4 birds were used as negative controls

#### *Neutralization assay*

To determine circulating antibody titers, the method of Habel was used (349). The serum neutralization assay was performed as described by Collins *et al.* (COLLINS; 1993). Briefly, sera were inactivated at 56 °C for 30 min. Using 96-well plates (Corning, St. Louis, USA), 200 µl of antibiotic-supplemented medium was added per well. Subsequently, 50 µl of each serum sample to be tested was added, and base 2 dilutions were performed. Finally, 50 µl of previously titrated virus samples was added, and the plates were incubated for 1 h at 37 °C. To each well, 100 µl of chicken-related embryo cells (CER – at  $5 \times 10^5$  cells/ml) were added to each well, and the plates were maintained for five days until a cytopathic effect

was evident. Serum positive (SHS-119-BR) and negative controls against aMPV were produced using this same procedure in our laboratory, and each plate had its own cellular control. Neutralizing titers are expressed as base 2 logarithmic values of the highest dilution with a 100% effective inhibition of CPE. Titers lower than 1:4 were considered negative.

#### BPL effect on aMPV immunogenicity

*Immune responses of SPF birds inoculated with BPL-inactivated aMPV samples.*

Two variables were analyzed: the immune response pattern and exposure to BPL combined with HP-inactivating methods. Previously standardized samples were used *in vitro*, and the same experimental design was employed. Fifteen-day-old SPF birds (30) were divided into three groups. Blood samples were drawn from the brachial vein of each bird from all groups before the virus samples were administered and then again after thirty days. Afterwards, neutralizing antibodies from these birds were used for titrations as described above. Group 1 birds were inoculated with 1.0 ml of a  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml aMPV solution previously inactivated with 0.1% BPL with MOE adjuvant through two administration routes, in the neck and intramuscularly in the thigh. A booster dose was administered following this same protocol. Group 2 birds were inoculated with a HP and BPL combined inactivation strategy, maintaining the same conditions of inoculum, routes and booster procedures. Group 3 birds were inoculated with culture media for control purposes. The birds were examined daily for clinical signs of the aMPV infection.

*HP effect on aMPV immunogenicity, field study branch and challenge with virulent SHS-119-BR*

Five-week-old SPF chickens (60) were divided into 3 groups (30, 15, 15). These birds were immunized with HP-inactivated aMPV samples and challenged with the wild-type strain, SHS-119-BR. Antibody titers were determined using ELISA and neutralization assays during the study period of six months to evaluate positivity until the posture period. Blood samples were taken at weeks 6, 8, 10, 12, 14, 17, 21 and 23. Group 1 birds were inoculated with HP-inactivated aMPV, as previously described, and challenged after 30 days (10-week-old birds) with the wild-type strain through two routes: 1.0 ml intranasally and 1.0 ml intraocularly. The group 2 birds were challenged during this same time period but were not primed with HP-inactivated aMPV. The group 3 birds were used as controls and housed in a separate room to avoid cross contamination.

*ELISA*

Flockscreen TRT (Guildhay Ltd, England), a commercial antibody diagnostic kit, was used as an indirect method for aMPV A and B subtype detection. Briefly, serum samples were diluted in PBS (1:500), and 50 µl of the dilution was applied to 96-well plates in triplicates. Positive and negative controls were included. The plates were covered and incubated for 60 min (37 °C) and washed with a buffered solution and sodium azide. Anti-chicken conjugate (50 µl) was added to each well. After the incubation period and wash procedure, 50 µl of enzyme substrate was

added to each well, and the reaction was incubated for 30 min (37 °C). Stop solution was then added, and spectrophotometric readings were performed at 550 nm on a microtiter plate reader. Data sets were plotted as base 2 logs, corresponding to each optical density read.

### Statistical Analysis

Linear regressions were calculated to better access the viral titers during the experiments. A student's t-test was performed to access the results. An alpha of 5% was considered. All calculations were made using the Origin Pro 8 software package.

### Results

#### *Virus titration*

Mean titers obtained for the aMPV SHS-119-BR strain tested were  $3.16 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL. This virus was used as a starting point to all experiments.

#### *HP effect on aMPV samples*



A range of pressure from 0 to 150 MPa had little impact on virus titers, and inactivation rates were higher up to 250 MPa. Figure 1 depicts the downward slope at higher pressures, up to 300 MPa. Based on these data, 250 MPa was employed in our experiments.

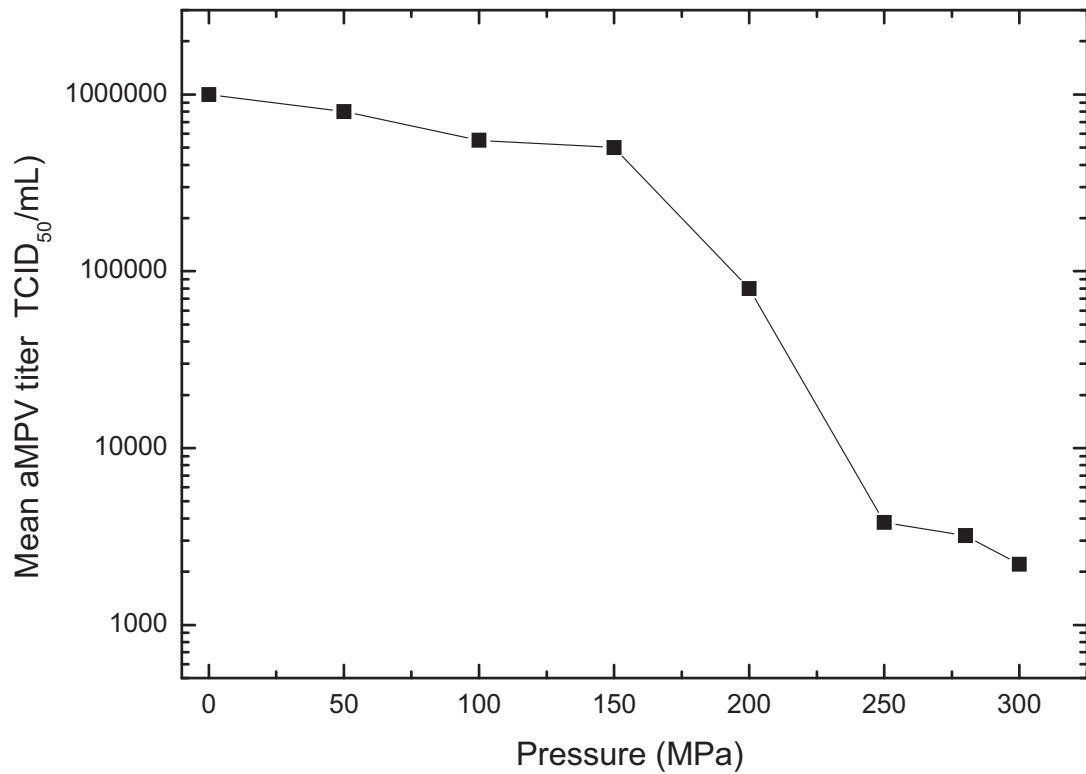


Figure 1: Effect of hydrostatic pressure on aMPV titers (inoculum of  $3.16 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml). Viral suspensions were exposed for 60 min at pressures of 50 through 300 MPa.

### Effect of prolonged exposure at 250 MPa on aMPV infectivity

Viral samples retained the ability to replicate in cell cultures after exposure of up to 100 min of 250 MPa HP treatment. Figure 2 shows different time points where an aMPV sample was exposed to a pressure of 250 MPa. A mean base 2 logarithmic point reduction was observed when virus samples were exposed to 250 MPa for 30 min, and up to 4 and 5 log reductions upon exposure times of 60 min and more, and after 100 min, respectively, were also observed.

Figure 2 illustrates reduced aMPV infectivity after a high-pressure treatment over the time points studied. Linear regression of the obtained viral titers was calculated to better adjust a line to the data points ( $R^2 > 0,8$ ). Based on these data, a linear model could be created to adequately describe the aMPV inactivation kinetics under HP treatment, thus providing a reliable model to determine infectivity reduction over time. There was a correlation between incubation periods, and a reduced infectivity allowed for this sample to be used as a standard in this study (120 min at 250 MPa).

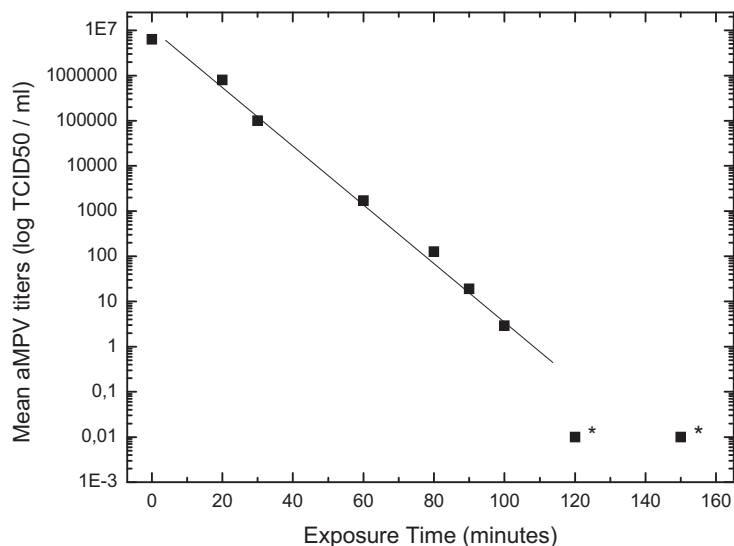


Figure 2: Time dependence of aMPV inactivation at 250 MPa. (\*): no detected virus.

Effect of BPL treatment including combined with HHP in reducing aMPV infectivity

Beta-propiolactone (BPL) is an alkylating agent that reacts with various nucleophilic agents, including nucleic acids and proteins. BPL is a colorless liquid, soluble in water and modifies the structure of nucleic acids after reacting mainly with purine residues (notably guanine). BPL induces the formation of DNA strand breaks as well as cross-links between DNA and proteins from the DNA strands of the double helix. BPL has also been used in hospitals in the form of gas for sterilizing thermolabile products.

Our study on the effect of BPL on aMPV was intended to provide parameters to compare the efficiency of high hydrostatic pressure as an inactivating method against this chemical agent. BPL exposure showed

concentration-dependent inactivation of viral replication with the greatest levels of inactivation seen with 0.2% BPL treatment and incomplete activation seen with 0.05% BPL treatment. The 0.05% condition was employed for the subsequent experiments.

Figure 3 shows a marked reduction in aMPV infectivity when the treatments were combined, that is, a pressure of 250 MPa combined with a 0.025% BPL treatment reduced viral titers up to 5 logs.

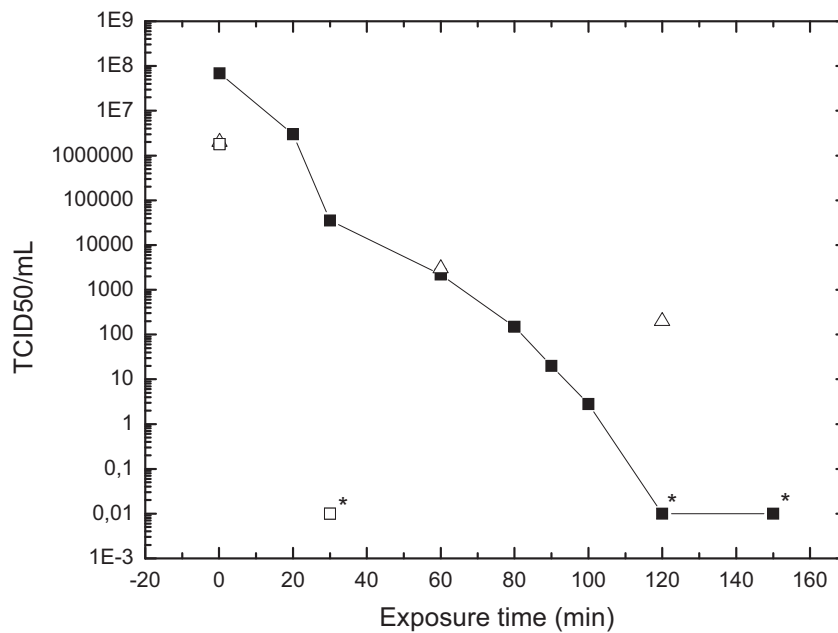


Figure 3: Effect of time exposure in BPL on aMPV infectivity, the isolated effect of 0.025% BPL and the combined effect of the BPL-HP treatment. Close squares: HP (250MPa). Open triangles: 0.025% BPL treatment. Open squares: Combined BPL-HP treatment. (\*): no detected virus.

In vivo study on the HP effect of aMPV immunogenicity

## Immune response of chickens against HP-inactivated aMPV

The *in vivo* immunogenicity of the HHP inactivated samples was then tested. Two weeks after the inactivated virus was administered, there were similar titers of generated antibodies both in chickens inoculated with HP-inactivated virus and with non-inactivated virus, and a similar viral titer was observed (Table 1). Similar response levels were registered for samples with and without the adjuvants, when comparing the immune responses generated both with the HP-inactivated virus and the BPL-inactivated virus .

**Table 2: Neutralizing antibodies from SPF chickens after 21 days p.i. with HHP-inactivated aMPV samples and control samples**

<b>Viral suspension</b>	<b>Neutralizing titers*</b>	<b>p (Student's t-test)</b>
HHP aMPV-inactivated samples without adjuvants	7,6 (0,5)	0.15
HHP aMPV-inactivated samples with adjuvants	7,6 (1)	0.28
Native aMPV samples with adjuvants	7,8 (0,6)	NA
Control non-inoculated birds	negative	NA
SHS-119-BR #	7,8 (0,3)	NA
Mock Infected– #	negative	NA

\* Logarithmic values. Standard deviations in parenthesis # Laboratory internal controls.

## BPL effect on aMPV immunogenicity

Immune responses of SPF chickens inoculated with BPL-inactivated samples and BPL-HP-inactivated samples.

It was observed that 80% of the birds immunized with aMPV/0.1% BPL-inactivated samples had higher antibody titers when compared with those immunized with the combined treatment of 0.025 BPL and HP. The control inoculated samples showed only background levels of antibodies titers, as shown in Table 2.

**Table 3: Antibody titers from SPF chickens 21 days p.i. with 0.1% BPL inactivated aMPV and with 0.025% BPL-HP inactivated aMPV**

<b>Viral suspension</b>	<b>Neutralizing Antibody titers</b>	<b>p (Student's t-test)</b>
BPL (0.1%)-inactivated aMPV sample, adjuvant used MOE	7,1 (0,7)	0.006
BPL (0.025%)-inactivated aMPV sample under 250 MPa of HHP for 30 min, adjuvant used MOE	6,1 (1,4)	0.001
Control non-inoculated birds	negative	NA
SHS-119-BR #	7,8 (0,3)	NA
Mock Infected <sup>#</sup>	negative	NA

<sup>\*1</sup> Logarithmic values. Standard deviations in parenthesis. <sup>\*2</sup> Laboratory internal controls. NA: Not applicable

#### HHP effect on aMPV immunogenicity

Immune responses of SPF chickens inoculated with HP-inactivated samples.

The mean neutralizing titer 13 weeks after challenge was 6.8. Of the total of 27 birds in this experiment, nine presented neutralizing anti-aMPV antibody titers

greater or equal to 7, whereas 2 birds presented a titer  $\geq 6$ . Eight birds presented titers of  $\geq 5$ , and 8 birds presented antibody titers of  $\geq 4$ .

The variation of neutralizing antibody titers obtained for the negative control group, which was formed by birds only challenged throughout the assay, was used as a reference. Only two weeks after the challenge with native aMPV, the birds presented serum conversion (antibody titers higher than 3.0). A strong immune response, indicated by a peak in antibodies, was detected 4 weeks after the challenge. The birds remained positive until the end of the experiment, with values lower than those observed for birds inoculated with HHP-treated aMPV samples before the challenge. Even though the negative control group was housed in a different room to avoid being infected with viral particles during the challenge phase, there was a small response in the negative control group observed in blood samples taken between 9 to 13 weeks after the challenge from the control groups.

Table 4: Neutralizing antibody titers after inoculation of aMPV samples subjected to HHP (120 min at 250 MPa) followed by challenge with native aMPV. Table shows the results from the ELISA testing of the collected sera.

<b>Age (/w)</b>	<b>Treatment</b>	<b>Positive bird antibody titers (range)</b>	<b>Positive birds / Inoculated</b>
6,5	HHP inoculation	-	0/30
8	Booster with HHP sample	892-1109	3/30
10	Native aMPV challenge	988-1726	12/30
12,5		993-4372	26/30
14		1002-4536	22/29
17		1212-2302	17/28
20,5		825-1901	13/28
23		932-1401	14/27

## Discussion

Although not yet fully understood, it is known that after pressurization, virus envelope proteins suffer a conformation rearrangement, which confers a loss of infectivity to the virions, but retain their immunogenicity. This phenomenon has been reported for viral particles of importance in human and animal health, which makes this finding very valuable as an alternative for the production of viral vaccines (204, 205, 339, 345, 350). .



Several genera have been studied based on this finding, but currently no data have been presented on the effect of high pressure on paramyxoviruses. The results of this study indicate that the suspensions of aMPV that underwent HPP treatment generated similar antibody titers to BPL treated samples and to naive virus samples, as confirmed by our immune response experiments.

Mathematical models for predictions on the kinetics of the infectivity loss of viral particles are crucial to vaccine design (345). However, empirical experiments are still required to validate these models. The initial viral titers obtained from maintenance growth in tissue culture were low ( $10^6$ - $10^7$  DICT50/ml) in comparison to other studies ( $10^6$  to  $10^{10}$  TCID50/ml), as expected for this virus (351-353). High pressure causes a concentration-dependent disassociation of protein aggregates allowing for the study of the behavior of individual proteins (351). High pressure is able to dissociate some viral particles, as well as oligomeric proteins, irreversibly or partially reversibly when returned to atmospheric pressure. Therefore, there is a pattern of reversibility in the dissociation and recovery of native properties, which is determined by the size and number of subunits of the protein and the added complexity of the interactions in the original aggregates (214, 217, 219, 351).

The appearance of defective particles after pressurization is most likely analogous to the formation of oligomers that have undergone conformational drift. Viral particles display a pattern of greater complexity compared to oligomeric proteins. Among these complexities are interactions with the capsid and nucleic acids and, in enveloped viruses, those of the capsid with membrane-embedded

proteins. On aMPV, surface glycoproteins G (attachment) and F (fusion) induce the production of neutralizing antibodies (327). These viral proteins are anchored in the membrane and are in contact with the capsid proteins via the matrix protein (M). It has been speculated that the matrix protein is a site of action of HHP on enveloped viruses, such as AMPV, which fully or partially inactivates the particles while maintaining its immunogenicity. Using VSV as a model, Silva et al. (351) suggested that the electrostatic nature of the protein interactions between the virus and the cell receptor after the HP treatment could be the determining factor of sensitivity to dissociation by pressure. These authors used this approach to interpret the strong effect of pressure on the infectivity of VSV and maintaining the immunogenicity of the particle. In our work, the HP effects were evaluated both *in vitro* and *in vivo* models to assess the impact of this treatment on aMPV replication and immunogenicity.

Two studies using electron microscopy have provided evidence that pressurized viral particles are morphologically altered, specifically their enveloped viral proteins, and associated this result with inactivation and an increased immunogenicity (204, 205, 351). Our results show that the virus retained immunogenicity after inactivation, as seen by the reduced titers observed after HHP treatments. Microscopic observations of HSV-type 1 and HCMV after pressurization indicate that pressures in the range of 300 MPa lead to damage of the viral envelope with a loss of the ability to adhere to VERO and HeLa cells (Nakagami et al., 1992).

After incubating samples of the Mayaro virus for 3-8 hours at 250 MPa, Gaspar (214) observed that changes were only detected on the virion surfaces of those samples pressurized for 8 h. The drop in infectivity studies of these suspensions showed that this virus is not resistant to pressure, and these same observations were made during our experiments (Figure 1). These observations suggest that high pressure induces conformational changes and disturbances that contribute to a reduction in viral replication.

Tian et al. (341) exposed Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) samples to pressures in the range of 240 MPa. Observations using electron microscopy illustrated changes on the surface of the envelope particle. Although not infective, pressurized samples displayed greater capacities to generate immune responses than non-pressurized samples when inoculated into rabbits.

These results, which were observed in several experiments, indicate that there is a net effect from HHP on membranes and on surface-exposed proteins that this phenomenon affects the infectivity and immunogenicity of viral particles. Adaptation to the seabed may be taken into account when explaining the effect of HHP on membranes. In fish collected at different depths, the amount of unsaturated lipids is related to the hydrostatic pressure of the natural habitat, thus ensuring a constant fluidity in a given location. Low temperatures and high pressure both act in the same manner in making biological membranes more rigid, reducing their fluidity, and possibly interfering with their functions (354, 355) thus suggesting a possible alternative mechanism by which HHP is thought to modify

membrane rigidity that needs further investigation to be confirmed. Nevertheless, as stated by Lou et al., the HP method has effect on the virus envelope and / or the virus capsid and the pH and temperature restrictions imposed by their experiments had an envelope-independent effect and varied substantially among the three viruses tested, but in conclusion the HP method was concluded to be efficient in its purpose (353).

These observations suggest that HHP inactivates enveloped viruses through injuries to the structure of the envelope. Such evidence suggests a hypothesis that might explain the effect of high pressure on the pattern of infectivity and immunogenicity of pressurized aMPV.

*In vitro* studies demonstrated that the higher the pressure of incubation, the greater the reduction in AMPV infectivity (Figure 1). There was a low rate of inactivation up to 150 MPa. Beyond this pressure the rate of inactivation significantly increased.

The results presented in Table 1 show that the decrease in AMPV infectivity when exposed to a pressure of 250 MPa from 100 min was >5 log and from 120 min was >7 or 8 log. These data were obtained by extrapolating the straight line calculated using the linear regression of the observed viral titers. Similarly, an exposure time of 150 min reduce the infectivity of the virus suspension to >8-9 log. Figure 5 also shows that when the samples were exposed to the increased pressure for a longer period of time, AMPV inactivation was more efficient, therefore becoming a safer suspension for use as a vaccine. These results

demonstrated that AMPV has a significant susceptibility to high pressure and that its degree of inactivation is dependent on the exposure time to pressure.

Greater sensitivities have been reported for some retroviruses: 10 min of exposure to 400 MPa led to a reduction of >7 log for HSV-1, 4 log for HCMV and 5.5 log for HIV type 1 (204, 205). IBDV has a higher sensitivity at 0 °C, which is decreased by >4.5 log after 60 min of exposure to 230 MPa (341).

Studies with non-enveloped viruses indicate that the effect of high pressure on these viruses results in permanent conformational changes of their viral capsid proteins. Pontes noted that the pressurization of the bovine rotavirus (UK strain) and simian (SA 11, variant 4S) resulted in infective and immunogenic particles (212). Dimers of VP4 in the form of spikes in the superficial layer of the particle would be more exposed to the effects of pressure. However, its immunogenic activity is maintained because of the structure of this protein, which is strongly linked to its internal capsid. A similar result has been observed for IBDV VP2. A suspension of pressurized IBDV undergoes inactivation; however, it is processed via the internal mechanisms of antigen presentation and is still able to generate immunogenic antibody titers, which is similar to native particles (Tian, et al., 2000).

In Table 2, it is shown that 0.05% AMPV is resistant to BPL, but the suspension is completely inactivated at concentrations of 0.1 and 0.2%. Below 0.1% and after 2 h of contact with this agent, the initial population of the viral suspension decreased >4.5 log. Exposure for 1 h at a final concentration of

0.025% led to a 3 log reduction in infectivity while two hours of exposure to this same concentration led to a 4 log reduction.

The results of the kinetic studies on AMPV inactivation allow for comparisons of the effect of pressure and BPL alone and in combination on the viral suspension (Figure 6 and Table 3). When the virus was exposed to pressure alone (250 MPa for 60 min), at least a 3 to 4 log reduction in AMPV infectivity was initially observed at  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL. This same pattern of inactivation was observed when this viral suspension was exposed to BPL at 0.025% for 60 and 120 min. The combination of the two agents (BPL at 0.025% and 250 MPa for 30 min) resulted in a marked increase in the inactivation of the virus.

The inactivating effect of incubating the isolated VSV under pressure (250 MPa) was increased by 3 log when combined with 1 M urea for 30 min (Silva et al 1992). Based on the observations of Gaspar (2000), after 180 minutes of pressurization (up to 200 MPa), a suspension of Mayaro virus decreased 7 log in viral infectivity; however, total inactivation of the suspension was not possible. A single exposure to UV light (104 erg/mm<sup>2</sup>) for 30 minutes reduced this virus's initial population by 99%. Because the combination of these two agents was more efficient, less power (103 erg/mm<sup>2</sup>) was required to obtain a similar inactivating effect. These results suggest that the effect of pressure on the molecular determinants of the infectivity of viral particles might be enhanced by both chemical and physical agents known for their inactivating properties.

The maintenance of immunogenicity has been explained by some authors. The fusion of viral particles to the membrane of the target cell is an input stage of the particle in the host. In enveloped viruses, this process can occur directly between the virus and the membrane of the cell while, at a neutral pH, the process is similar to what occurs for HIV and AMPV. Indirect melting occurs when there is the formation of an endocytic vesicle that fuses with the cell membrane in response to a reduced pH (Gaspar, 2000). An intermediate state of fusion has been observed in several enveloped viruses but not in others. During the fusion with the cell membrane, there are changes in the conformation of the protein layer, as well as with envelope proteins, which leads to temporarily inactive particles. This phenomenon can also expose previously hidden epitopes that are essential for the generation of an immune response. When studying rotavirus, (212) observed similar changes to those described for HIV and for the influenza virus by Nakagami et al. (204). The envelope glycoproteins of these viruses undergo conformational changes triggered by the cell receptor, indicating their native state is metastable. Irreversible conformational changes in membrane glycoproteins caused by pressure changes resemble those that occur *in vivo* during the intermediate state of fusion. Gaspar et al. (214) used pressure as a method to characterize the active state of fusion using Sindbis and influenza, two enveloped viruses, as a model. Pressure induces the inactivation of influenza with a concomitant decrease in hemagglutinating activity. Therefore, pressure produces a similar effect to what is observed when the virus binds to cell receptors. La Casse et al. (356) suggested the use of fusion for complex subunit vaccines for HIV. These authors used

formaldehyde for the fixation of complex cells and virus immunogens generated from the molten state. These immunogens generated an antigenic response in many HIV isolates. Although this technique effectively places a cap on the extensive phase purification of a virus/cell mixture, the advantage of this technique is that the pressure produces a particle in a state that generates an adequate immune response in a more simple and controlled manner, which could be an alternate hypothesis to explain our results. For the group of birds inoculated with only aMPV, titers similar to titers obtained in birds inoculated with pressurized samples were observed (average = 7.6; Table 3). The aMPV is not considered a virus that generates a strong immune response in birds. The neutralizing sera titers obtained from chickens inoculated with the pressurized samples are considered within the normal range for this virus when there is seroconversion, and titers less than 3 are considered negative for this virus. Some authors have reported an increased immunogenicity in viral samples upon HPP treatment (212, 341). Suspensions of rotaviruses and inactivated IBDV under pressures of approximately 250 MPa generated neutralizing antibody titers higher than when rabbits were injected with native virus samples (212, 341). These results indicate that hydrostatic pressures induce highly immunogenic viral particles. These authors suggested that, for enveloped viruses, an increased particle immunogenicity after a pressure treatment may be due to the exposure of antigenic sites positioned throughout the membrane and that these sites, when at atmospheric pressure, are not naturally exposed due to strong interactions between protein subunits. After administration of the BPL-inactivated AMPV sample to the birds and two weeks



after inoculation, 60% of the birds had neutralizing sera titers higher than 6, and the remaining titers reached this level after 8 weeks (Table 3). The results of this study indicate that the viral sample inactivated using BPL alone was capable of a larger immune response in birds than the viral sample generated using a combination of this agent and pressure but the use of BPL as an inactivating agent might not be as safe as with HP. Obtaining immune responses comparable to BPL was indicative of the ability of pressure to lead to conformational changes in the AMPV particles' antigenic sites, which maintains functional responses to the same order of magnitude as those produced by this agent when used in the production of commercially available vaccines. Thus, this suggests that HPP is method for generating a vaccine candidates that is as effective as standard methods.

One of the goals of our experimental design included birds inoculated with the challenge virus (reference strain) in pressurized samples, and it was possible to observe the maintenance of a neutralizing anti-AMPV antibody titer at, or near a level above, that considered positive for post- immunization and challenge titers.

The birds that were 51 days old at the time of the first dose of the pressure-inactivated AMPV sample seroconverted (neutralizing sera titer >3) only two weeks after application of a booster dose.

Four weeks after the first inoculation, the mean titer of neutralizing antibodies was obtained from four birds, and, 2 weeks after challenge, 40% of the birds had neutralizing sera titers between 5 and 7 (table 4).

The birds in the positive control group (only challenged) also displayed a similar behavior in the fluctuation of neutralizing anti-AMPV antibodies (data not shown); that is, the birds that received a pressure-inactivated AMPV sample responded more quickly and strongly to a challenge with a virulent sample than the control birds. An antibody peak was recorded for the control birds (maximum titer of neutralizing antibodies = 8) only 5 weeks after the challenge. Jones et al. (1988) reported a similar variation in antibody titer in trials with AMPV experimental infections in birds, finding that the neutralizing sera onset of clinical symptoms was low. However, 5 to 7 days later, there was a peak in antibody production, whereas 4 weeks later the titer decreased. These authors emphasized that neutralizing antibodies persisted for approximately 4 to 5 weeks, and its titer generally decreased after this period. Neutralizing sera antibody titers (in growing chicken embryo trachea) of approximately 10 were determined by Cook et al. (357) when testing an experimental vaccine for the turkey rhinotracheitis virus for 4 weeks. Two weeks after inoculation with the attenuated vaccine, the authors found the highest neutralizing sera levels, falling from 8 to 10 weeks after inoculation. This pattern of response most likely refers to the stage of the immune response normally observed in young birds one to two weeks after contact with the inactivated virus samples.

The results obtained for the antibody titers, as determined using ELISA, were in agreement with those obtained by neutralizing sera. Two weeks after inoculating the birds with the pressure-inactivated sample, only 20% of the birds showed seroconversion to aMPV. The antibody titers increased from this period

onwards, and, during the application of the challenge with the virulent AMPV sample, 80% of the birds already had antibody titers above the cutoff of the ELISA. A peak antibody titer was observed 4 weeks after application of the challenge, reaching a range of 10 to 12.4. Then, a drop was observed in the antibody titer, which remained until the end of the study. Similar results have been reported by several authors performing experiments evaluating inactivated vaccines (336, 344, 358).

After application of the challenge, 100% of the birds were aMPV positive, and, by the end of the experiment (17 weeks after application of the pressurized aMPV sample), 75% of the birds remained in this condition. We observed a decrease in antibody titer, as determined by ELISA, from the moment of the application of the attenuated vaccine and up to 2 weeks after the vaccination (from 10.0 to 7.8). In the periods 8, 16, 24 and 29 weeks after the vaccination, the obtained titers fell even more, below the level considered positive (presence of anti-TRT). The antibody titer was increased 8 weeks after application of the inactivated vaccine, which featured a strong immune response in the birds to this type of vaccination (increase in the titer:  $\log_2 < \log_2 16$  to 7). The authors concluded that the inactivated vaccine conferred a more efficient immune response against the AMPV to the birds. Cook et al. (1999) characterized the AMPV isolated from turkeys displaying a respiratory disease in the U.S. (Colorado strain) and conducted experiments on chickens (SPF) and turkeys (aMPV-free from maternal antibodies) that were kept in isolation. The birds were vaccinated with the attenuated vaccine (aMPV of two subgroups: A and B) at one-day-old and

challenged with the virulent aMPV strain at three weeks of age. Their antibody titers were determined throughout the experiment (up to 10 days after challenge) using ELISA plates prepared with aMPV, subgroups A and B, and aMPV/isolated Colorado. In the present work, the control birds and challenged unvaccinated birds displayed antibody titers (<7.0 to 10.8) similar to those obtained after immunization and a challenge with aMPV. The antibody titer of the vaccinated birds after three weeks was 7.0 to 10. Ten days after the second vaccination, these titers increased, reaching values 9.4 to 13.3. Therefore, the lack of apparent clinical signs indicated the efficiency of the vaccine for protecting the birds against the studied.

One purpose of this study was to produce an inactivated sample, which would prevent the addition of a new strain to the environment or the possibility that the strain used does not confer cross-protection during exposure to different serotypes, that is, aMPV-A or B without the risks involved in chemical inactivation in larger scales. For use as an inactivated vaccine, a viral suspension must meet certain requirements. The most fundamental is proof of safe inactivation, and the particle must retain its immunogenicity, which is dependent on its integrity. In view of the results obtained for the aMPV in this study, the pressurization of viruses meets these two basic requirements for a vaccine formulation, as described above. The use of pressure in the preparation of inactivated vaccines may have some advantages over methods such as chemical inactivation or attenuation. Particles can reverse attenuate after a certain period of time and lead to the disease that they were designed to prevent. The use of subunit vaccines has the disadvantage

of generating a less efficient immune response than that generated by the presentation of part of the particle.

Pressurized aMPV suspensions are as effective as particles that have not been pressurized to generate neutralizing antibodies to seroconvert, therefore protecting the inoculated organism from a possible illness when exposed to a wild strain. The results of the present study suggest that these suspensions could be used as immunogens for the preparation of inactivated vaccines for aMPV.

## References

- Bonafe, C. F., J. R. Araujo, et al. (1994). "Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure." Biochemistry **33**(9): 2651-2660.
- Bonafe, C. F., M. Glaser, et al. (2000). "Virus inactivation by anilino-naphthalene sulfonate compounds and comparison with other ligands." Biochem Biophys Res Commun **275**(3): 955-961.
- Bonafe, C. F., C. M. Vital, et al. (1998). "Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature." Biochemistry **37**(31): 11097-11105.
- Broor, S. and P. Bharaj (2007). "Avian and human metapneumovirus." Ann N Y Acad Sci **1102**: 66-85.
- Ceylan, C., F. Severcan, et al. (2012). "Biophysical and microbiological study of high hydrostatic pressure inactivation of Bovine Viral Diarrheavirus type 1 on serum." Vet Microbiol **154**(3-4): 266-271.
- Chong, P. L., B. W. van der Meer, et al. (1985). "The effects of pressure and cholesterol on rotational motions of perylene in lipid bilayers." Biochim Biophys Acta **813**(2): 253-265.
- Cook, J. K. (2000). "Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens." Vet J **160**(2): 118-125.
- Cook, J. K., J. Chesher, et al. (2000). "Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies." Avian Pathol **29**(6): 545-556.
- Cook, J. K., M. M. Ellis, et al. (1989). "A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 1. Stability of the attenuated strain." Avian Pathol **18**(3): 511-522.
- D'Arce, R. C., L. T. Coswig, et al. (2005). "Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction." Avian Pathol **34**(2): 133-

- Dani, M. A., E. L. Durigon, et al. (1999). "Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR." J Virol Methods **79**(2): 237-241.
- Duraes-Carvalho, R., A. R. Souza, et al. (2012). "Effect of High Hydrostatic Pressure on *Aeromonas hydrophila* AH 191 Growth in Milk." J Food Sci **77**(8): M417-M424.
- Ferreira, E., Y. S. Mendes, et al. (2009). "Effects of hydrostatic pressure on the stability and thermostability of poliovirus: a new method for vaccine preservation." Vaccine **27**(39): 5332-5337.
- Ganapathy, K., A. Bufton, et al. (2010). "Vaccination of commercial broiler chicks against avian metapneumovirus infection: a comparison of drinking-water, spray and oculo-oral delivery methods." Vaccine **28**(23): 3944-3948.
- Gaspar, L. P., Y. S. Mendes, et al. (2008). "Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: implications for vaccine development." J Virol Methods **150**(1-2): 57-62.
- Gaspar, L. P., A. C. Silva, et al. (2002). "Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses." J Biol Chem **277**(10): 8433-8439.
- Gross, M. and R. Jaenicke (1994). "Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes." Eur J Biochem **221**(2): 617-630.
- Habel, K., N. P. Salzman, et al. (1969). Fundamental techniques in virology. New York, Academic Press.
- Hervas, D., J. Reina, et al. (2012). "Epidemiology of hospitalization for acute bronchiolitis in children: differences between RSV and non-RSV bronchiolitis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(8): 1975-1981.
- Isbarn, S., R. Buckow, et al. (2007). "Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure." J Food Prot **70**(3): 667-673.
- Juhasz, K. and A. J. Easton (1994). "Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups." J Gen Virol **75 ( Pt 11)**: 2873-2880.
- Kahn, J. S. (2006). "Epidemiology of human metapneumovirus." Clin Microbiol Rev **19**(3): 546-557.
- Kingsley, D. H., H. Chen, et al. (2004). "Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure." Virus Res **102**(2): 221-224.
- Kingsley, D. H., D. G. Hoover, et al. (2002). "Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure." J Food Prot **65**(10): 1605-1609.
- Kovac, K., M. Diez-Valcarce, et al. (2012). "Effect of high hydrostatic pressure processing on norovirus infectivity and genome stability in strawberry puree and mineral water." Int J Food Microbiol **152**(1-2): 35-39.
- LaBarre, D. D. and R. J. Lowy (2001). "Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays." J Virol Methods **96**(2): 107-126.
- LaCasse, R. A., K. E. Follis, et al. (1999). "Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV." Science **283**(5400): 357-362.
- Ling, R., S. Sinkovic, et al. (2008). "Deletion of the SH gene from avian

- metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame." J Gen Virol **89**(Pt 2): 525-533.
- Lori, S., R. Buckow, et al. (2007). "Predictive model for inactivation of *Campylobacter* spp. by heat and high hydrostatic pressure." J Food Prot **70**(9): 2023-2029.
- Lou, F., H. Neetoo, et al. (2011). "Lack of correlation between virus barosensitivity and the presence of a viral envelope during inactivation of human rotavirus, vesicular stomatitis virus, and avian metapneumovirus by high-pressure processing." Appl Environ Microbiol **77**(24): 8538-8547.
- Maharaj, S. B., D. K. Thomson, et al. (1994). "Isolation of an avian pneumovirus-like agent from broiler breeder chickens in South Africa." Vet Rec **134**(20): 525-526.
- Nakagami, T., H. Ohno, et al. (1996). "Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure." Transfusion **36**(5): 475-476.
- Nakagami, T., T. Shigehisa, et al. (1992). "Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure." J Virol Methods **38**(2): 255-261.
- Pontes, L., Y. Cordeiro, et al. (2001). "Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein Vp4." J Mol Biol **307**(5): 1171-1179.
- Ritz, M., P. Courcoux, et al. (1998). "High hydrostatic pressure inactivation of *Salmonella typhimurium*: effects of pressure, duration, pH and temperature studied by analysis of variance." Vet Res **29**(6): 547-556.
- Rutberg, L. (1964). "On the Effects of High Hydrostatic Pressure on Bacteria and Bacteriophage. 2. Inactivation of Bacteriophages." Acta Pathol Microbiol Scand **61**: 91-97.
- Sanchez, G., R. Aznar, et al. (2011). "Inactivation of human and murine norovirus by high-pressure processing." Foodborne Pathog Dis **8**(2): 249-253.
- Santos, J. L., R. Aparicio, et al. (2008). "Different urea stoichiometries between the dissociation and denaturation of tobacco mosaic virus as probed by hydrostatic pressure." Biophys Chem **134**(3): 214-224.
- Santos, J. L., J. A. Bispo, et al. (2004). "Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure." Biophys Chem **111**(1): 53-61.
- Seal, B. S., H. S. Sellers, et al. (2000). "Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates." Virus Res **66**(2): 139-147.
- Silva, J. L., P. Luan, et al. (1992). "Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus." J Virol **66**(4): 2111-2117.
- Silva, J. L., M. Villas-Boas, et al. (1989). "Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin." J Biol Chem **264**(27): 15863-15868.
- Tian, S. M., K. C. Ruan, et al. (2000). "Effects of hydrostatic pressure on the structure and biological activity of infectious bursal disease virus." Eur J Biochem **267**(14): 4486-4494.