



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**MARGARETH DE ARAÚJO SILVA**

*Análogos de a1E2 de HPV 18: o Papilomavirus como Modelo para Interferência Nucleica  
via Domínios Peptídicos Mínimos*

**Rio de Janeiro  
(Novembro/2013)**

**MARGARETH DE ARAÚJO SILVA**

*Análogos de a1E2 de HPV 18: o Papilomavirus como Modelo para Interferência Nucleica  
via Domínios Peptídicos Mínimos*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Luís Maurício Trambaioli Lima

**Rio de Janeiro**  
**(Novembro/2013)**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**S586a** Silva, Margareth de Araújo.

Análogos de a1E2 de HPV 18: o papilomavírus como modelo para interferência nucleica via domínios peptídicos mínimos/ Margareth de Araújo Silva; orientador Luis Mauricio Trambaioli Lima. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013.

97f.f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. HPV. 2. a1E2. 3. Interferência nucleica. 4. Domínios peptídicos mínimos. 5. Papilomavírus. I. Lima, Luis Mauricio Trambaioli. II. Título.

**CDD 615.1**

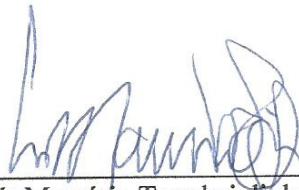
# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Margareth de Araújo Silva**

*Análogos de  $\alpha 1E2$  de HPV 18: o Papilomavirus como Modelo para Interferência Nucleica  
via Domínios Peptídicos Mínimos*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 06/11/2013



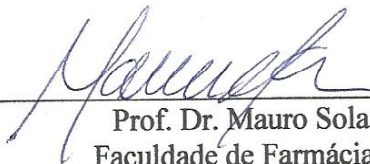
---

Prof. Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima  
Faculdade de Farmácia - UFRJ



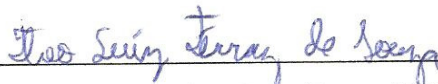
---

Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro  
Instituto de Química - UFRJ



---

Prof. Dr. Mauro Sola Penna  
Faculdade de Farmácia - UFRJ



---

Prof. Dr. Theo Luiz Ferraz de Souza,  
Faculdade de Farmácia - UFRJ

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que oferecem uma parte de seu tempo de vida ao estudo de meios para se melhorar a qualidade de vida de outras pessoas, e a seus familiares que são privados do convívio com tais pessoas no tempo investido na ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os colegas de laboratório, por toda a ajuda, companheirismo, paciência e estímulo recebidos durante esses dois anos de mestrado.

Agradeço aos amigos e colegas de trabalho Angelo Amaro e Bruno (portuga) pelas revisões e conselhos sobre a dissertação, além de toda a ajuda durante esses dois anos de mestrado.

Agradeço a Maely, que tem sido uma amiga, incentivadora, instrutora, coorientadora e revisora incrível, além de ser uma irmã para mim.

Agradeço ao prof. Maurício pela oportunidade de desenvolver um projeto numa área que considero de relevância social, pela possibilidade de alterar a mortalidade ou morbidade de uma doença.

Agradeço à minha família pelo incentivo desde sempre recebido. Agradeço ao meu companheiro Anderson pela paciência comigo e com minha agenda apertada de compromissos.

Peço desculpas a minha afilhada Luísa por não ter estado tão presente quanto queria nesses seus dois primeiros anos de vida.

Agradeço a Deus pelas oportunidades pessoais e profissionais que tive até esse momento, sabendo que muitas pessoas não tiveram, nem tem ou terão oportunidades de desenvolverem seus potenciais em diversas áreas do conhecimento, devido à desigualdade social, limitações físicas ou a razões que desconhecemos e chamamos de destino.

## RESUMO

SILVA, Margareth de Araújo. *Análogos de  $\alpha$ 1E2 de HPV 18: o Papilomavirus como Modelo para Interferência Nucleica via Domínios Peptídicos Mínimos*. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O papilomavirus humano (HPV) é o vírus sexualmente transmissível mais comum no mundo. Os subtipos HPV16 e 18 são encontrados em 70% dos casos de câncer cervical (CC) no mundo. CC é o 2º tipo de câncer mais incidente entre mulheres no Brasil. Vacinas profiláticas e terapêuticas contra HPV vêm sendo estudadas. Estima-se que os tratamentos contra CC apresentem efetividade de 90%, com consideráveis mortalidade, custo e recidiva. O genoma viral codifica diversas proteínas, dentre elas E2, que atua na replicação e na expressão de proteínas oncogênicas virais. Observou-se que um peptídeo derivado da hélice 1 da proteína E2 ( $\alpha$ 1E2) de HPV16 foi capaz de ligar-se ao seu DNA alvo, indicando não ser necessária a proteína E2 inteira para haver a ligação de  $\alpha$ 1E2 ao DNA. A interação peptídeo – DNA, pela ausência do domínio de ligação à proteína viral E1, poderia ocasionar a inibição da replicação viral e da expressão das proteínas oncogênicas. Porém, a afinidade desse peptídeo pelo DNA de HPV é cerca de 100 vezes menor que a da proteína E2. 9 peptídeos análogos à  $\alpha$ 1E2 foram propostos por esse trabalho, com o objetivo de ampliar o estudo da interação  $\alpha$ 1E2-DNA de HPV, buscando-se aumentar a sua afinidade e seletividade por esse DNA. A afinidade dos peptídeos desenvolvidos nesse trabalho por DNA de HPV foi investigada contra um oligonucleotídeo genérico de HPV contendo a sequência palíndromo ACCG-NNNN–CGGT, onde a proteína E2 viral se liga. A seletividade dos peptídeos foi avaliada comparando-se a *Kd* da ligação dos mesmos ao DNA de HPV e a 2 DNAs não específicos. A estrutura secundária dos peptídeos foi investigada por Dicroísmo Circular (DC) e Infravermelho (FTIR). Todos os peptídeos apresentaram estrutura secundária randômica. Dois peptídeos mostraram aumento de afinidade por DNA de HPV em relação ao peptídeo original, sugerindo que uma estrutura secundária estabilizada em  $\alpha$ -hélice não seja imprescindível para sua interação com o DNA consenso.

## ABSTRACT

SILVA, Margareth Araújo.  *$\alpha$ 1E2 analogs of HPV 18: Papillomavirus as the Model for Nucleic Interference via Minimum Peptide Domains*. Rio de Janeiro, 2013. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted virus in the world. Subtypes HPV 16 and 18 are found in 70% of cases of cervical cancer (CC) in the world. CC is the 2nd most frequent cancer among women in Brazil. Prophylactic and therapeutic HPV vaccines are being studied. CC treatments is estimated to have effectiveness of 90% with significant mortality, cost, and recurrence. The viral genome encodes several proteins, among them E2, which operates in the replication and expression of viral oncogenic proteins. It was noted that a peptide derived from the Helix 1 ( $\alpha$ 1E2) of HPV16 E2 protein was able to bind to its target DNA. Indicating the binding of  $\alpha$ 1E2 to HPV DNA does not require the entire E2 protein. Because of the absence of the binding domain of the viral protein E1, the peptide-DNA interaction could lead to the inhibition of viral replication and expression of oncogenic proteins. However, the affinity of this peptide for HPV DNA is approximately 100 times lower than that of E2 protein. 9 peptides analogous to  $\alpha$ 1E2 were proposed for this work, with the aim of expanding the study of interaction  $\alpha$ 1E2 - HPV DNA, trying to increase their affinity and selectivity for this DNA. The affinity of peptides developed in this work for HPV DNA was investigated against a generic HPV oligonucleotide containing the palindrome ACCG-NNNN-CGGT sequence, where the viral E2 protein binds. The peptides's selectivity was evaluated by comparing the *K<sub>d</sub>* of binding to HPV DNA and 2 non-specific DNAs. The secondary structure of the peptides was investigated by circular dichroism (CD) and infrared (FTIR). All peptides showed randomic secondary structure. Two peptides showed increased affinity for HPV DNA compared to the original peptide, suggesting that a stabilized  $\alpha$  -helix secondary structure is not essential for its interaction with consensus DNA .



## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
SUMÁRIO.....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 O papilomavirus .....	14
1.2 A INFECÇÃO POR HPV .....	15
1.3 O HPV E O CÂNCER.....	18
1.3.2 O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO .....	19
1.4 O RECONHECIMENTO NUCLEICO.....	20
1.4.1 ANÁLOGOS DE $\alpha 1E2$ .....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 PEPTÍDEOS E DNAs .....	26
3.2 ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	28
3.2.1 PARAMETRIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA LEITURA DE ANISOTROPIA COM DNA ESPECÍFICO E NÃO ESPECÍFICO .....	30
3.3 ENSAIO DE ISOTERMA DE LIGAÇÃO PEPTÍDEO-DNA .....	32
3.4 ESTEQUIOMETRIA DA LIGAÇÃO.....	34
3.5 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR .....	35
3.6 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR FTIR .....	37
4 RESULTADOS .....	39

4.1 PEPTÍDEOS ANÁLOGOS A $\alpha$ 1E2 .....	39
4.2 PARAMETRIZAÇÃO DO DNA ESPECÍFICO E NÃO ESPECÍFICOS.....	43
4.2.1 DNA ESPECÍFICO .....	44
4.2.2 DNA NÃO ESPECÍFICO A: (5' TAMRA)-poli(CG).....	46
4.2.3 DNA NÃO ESPECÍFICO B: (5'6-FAM)-DNA não específico .....	47
4.3 ENSAIO DE ISOTERMA DE LIGAÇÃO PEPTÍDEO-DNA .....	48
4.3.1 LIGAÇÃO $\alpha$ 1E2 x DNA ESPECÍFICO .....	48
4.3.1.1 Mutação da Cisteína <sub>301</sub> por Serina <sub>301</sub> : $\alpha$ 1E2b.....	49
4.3.1.2 Ligações dissulfeto: $\alpha$ 1E2c e $\alpha$ 1E2d.....	51
a) $\alpha$ 1E2c: ligação dissulfeto entre Cys <sub>294</sub> -Cys <sub>299</sub> .....	51
b) $\alpha$ 1E2d: ligação dissulfeto entre Cys <sub>302</sub> -Cys <sub>306</sub> .....	54
4.3.1.3 Ligação Metálica: $\alpha$ 1E2e e $\alpha$ 1E2f.....	56
a) $\alpha$ 1E2e: ligação metálica entre His <sub>299</sub> -His <sub>302</sub> coordenadas por Zn <sup>+2</sup> .....	56
b) $\alpha$ 1E2f: ligação metálica entre His <sub>302</sub> -His <sub>306</sub> coordenadas por Zn <sup>+2</sup> .....	58
4.3.1.4 Ligação dissulfeto(Cys <sub>294</sub> -Cys <sub>299</sub> ) + ligação metálica(His <sub>302</sub> -His <sub>306</sub> ): $\alpha$ 1E2g.....	60
4.3.1.5 Ligação dissulfeto(Cys <sub>294</sub> -Cys <sub>299</sub> ) + ligação salina(Asp <sub>302</sub> -Gln <sub>306</sub> ): $\alpha$ 1E2h.....	62
4.3.1.6 Ligação salina (Asn <sub>299</sub> -Asp <sub>302</sub> ): $\alpha$ 1E2i.....	64
4.3.1.7 Substituição por Alanina: $\alpha$ 1E2j (His <sub>309</sub> por Ala <sub>309</sub> ).....	66
4.3.2 ESTEQUIOMETRIA DAS LIGAÇÕES .....	76
4.4 LIGAÇÃO $\alpha$ 1E2 x DNA NÃO ESPECÍFICO .....	80
4.5 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR .....	82
4.6 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR FTIR .....	85
5 DISCUSSÃO .....	90
6 CONCLUSÕES .....	91
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo da partícula viral de HPV (adaptado de ROHL.....	14
Figura 2. Esquema da infecção por HPV .....	15
Figura 3. Esquema do genoma de HPV, mostrando a região dos genes que codificam cada uma das proteínas virais e suas respectivas funções no ciclo viral .....	16
Figura 4. Esquema dos domínios amino e carboxil terminais da proteína E2 de HPV.....	17
Figura 5. Domínio de ligação da proteína E2 de papilomavirus a DNA.....	22
Figura 6. Alinhamento da sequência primária de $\alpha 1E2$ de diferentes papilomavirus.....	22
Figura 7. Esquema de preparação da placa de 96 poços para experimentos de anisotropia por titulação seriada do peptídeo. ....	33
Figura 8. Modelo da sequência original da hélice 1 da proteína E2 de HPV18, da Gly294 a His309, representada pelo peptídeo $\alpha 1E2a(wt)$ .....	39
Figura 9. Esquema do peptídeo $\alpha 1E2a$ , mostrando as regiões do peptídeo que interagem ou não com o DNA de HPV. ....	40
Figura 10. Mutações pontuais.....	41
Figura 11. Mutantes com ligações dissulfeto. ....	42
Figura 12. Mutantes com ligações metálicas.....	42
Figura 13. Mutante com ligações dissulfeto e metálica.....	42
Figura 14. Mutante com ligações dissulfeto e salina.....	43
Figura 15. Mutante com ligação salina.....	43
Figura 16. Espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA específico.....	44
Figura 17. Espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA não específico.....	46
Figura 18. Avaliação da estabilidade do sinal de linha de base do espectro de excitação de fluorescência do DNA não específico A, a partir do SPECTRAMAX M5. ....	47
Figura 19. Espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA não específico B. ....	48
Figura 20. Comparação entre afinidade de $\alpha 1E2b$ frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	49
Figura 21. Comparação entre afinidade de $\alpha 1E2b$ frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	50
Figura 22. Afinidade de $\alpha 1E2c$ frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional. comparação. ....	51

Figura 23. Comparação entre afinidade de $\alpha$ 1E2c frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	52
Figura 24. Afinidade de $\alpha$ 1E2d frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	54
Figura 25. Afinidade de $\alpha$ 1E2d frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	55
Figura 26. Comparação entre afinidade de $\alpha$ 1E2e frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	56
Figura 27. Afinidade de $\alpha$ 1E2e por DNA específico em função da força iônica e de zinco. .	57
Figura 28. Comparação entre afinidade de $\alpha$ 1E2f frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	58
Figura 29. Afinidade de $\alpha$ 1E2f por DNA específico em função da presença de zinco.....	59
Figura 30. Curvas de afinidade de $\alpha$ 1E2g por DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	60
Figura 31. Curvas de afinidade de $\alpha$ 1E2g por DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	61
Figura 32. Afinidade de $\alpha$ 1E2h por DNA específico em diversas condições de meio reacional. ....	62
Figura 33. Comparação entre afinidade de $\alpha$ 1E2h frente a DNA específico em função da força iônica do meio reacional.....	63
Figura 34. Afinidade de $\alpha$ 1E2i por DNA específico em diferentes condições de meio reacional.....	64
Figura 35. Comparação entre afinidade de $\alpha$ 1E2i frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.....	65
Figura 36. Comparação entre afinidade de $\alpha$ 1E2a e $\alpha$ 1E2j por DNA específico de acordo com a força iônica do meio. ....	66
Figura 37. Afinidade de $\alpha$ 1E2j em função da força iônica do meio reacional.....	67
Figura 38. Curvas de afinidade dos análogos de $\alpha$ 1E2 nas condições planejadas de meio reacional, variando-se a força iônica do meio. ....	69
Figura 39. Comparação entre as constantes de dissociação ( $Kd$ ) dos diferentes peptídeos nas condições de tampão planejadas, frente a DNA específico, variando-se a força iônica do meio. ....	71

Figura 40. Comparação das constantes de dissociação ( $K_d$ ) entre os peptídeos e DNA específico nas condições reacionais planejadas, em função da força iônica do meio.....	72
Figura 41. Mapas de densidade eletrostática dos peptídeos $\alpha$ 1E2a a $\alpha$ 1E2f ligados a DNA de HPV18.....	74
Figura 42. Mapas de densidade eletrostática dos peptídeos $\alpha$ 1E2g a $\alpha$ 1E2j ligados a DNA de HPV18.....	75
Figura 43. Curvas com Estequiometria de 2 moles <sub>peptídeo</sub> : 1 mol <sub>DNA</sub> .	76
Figura 44. Curva com Estequiometria de 3 moles <sub>peptídeo</sub> : 1 mol <sub>DNA</sub> :	77
Figura 45. Curvas com Estequiometrias indefinidas frente a DNA específico:.....	77
Figura 46. Estequiometria da ligação de $\alpha$ 1E2e a $\alpha$ 1E2g frente a DNA específico.....	78
Figura 47. Afinidade de $\alpha$ 1E2a a $\alpha$ 1E2d por DNA específico e não específico.....	80
Figura 48. Comparação entre a afinidade dos peptídeos $\alpha$ 1E2e a $\alpha$ 1E2j por DNA específico e não específico .....	81
Figura 49. Espectros de CD na região do UV distante dos análogos de $\alpha$ 1E2.....	82
Figura 50. Espectro de CD na região do UV distante dos análogos de $\alpha$ 1E2 nas condições otimizadas para cada peptídeo.....	83
Figura 51. Espectros de Infravermelho (FTIR) de $\alpha$ 1E2.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais funções das proteínas de HPV .....	16
Tabela 2.	Classificação quanto à oncogenicidade dos subtipos de HPV em câncer de colo de útero.....	19
Tabela 3.	Parâmetros para leituras de anisotropia do DNA específico no espectrofluorímetro JASCO FP-6300.....	30
Tabela 4.	Parâmetros para leituras de anisotropia do DNA não específico no espectrofluorímetro JASCO FP-6300.....	31
Tabela 5.	Parâmetros para leituras de anisotropia no SPECTRAMAX M5.....	31
Tabela 6.	Parâmetros para leituras de anisotropia no espectrofluorímetro SPECTRAMAX M5.....	34
Tabela 7.	Parâmetros utilizados para a deconvolução dos espectros de FTIR dos peptídeos ..	38
Tabela 8.	Assinalamento das bandas da amida I no infravermelho, proposto por Barth e Zscherp ( <i>apud</i> GOORMAGHTIGH, 1994) e Goormaghtigh (GOORMAGHTIGH; RUYSSCHAERT; RAUSSENS, 2006) .....	38
Tabela 9.	Sequência primária dos peptídeos mutantes de $\alpha 1E2$ propostos.....	41
Tabela 10.	Anisotropia do DNA específico em diferentes condições de leitura.....	45
Tabela 11.	Anisotropia do DNA não específico A em diferentes condições de leitura .....	46
Tabela 12.	Constantes de dissociação ( $K_d$ ) dos peptídeos nas diferentes condições de tampão testadas, frente a DNA específico.....	68
Tabela 13.	Constantes de dissociação ( $K_d$ ) dos peptídeos nas condições planejadas de tampão testadas, frente a DNA específico.....	70
Tabela 14.	Conteúdo de estrutura secundária dos análogos de $\alpha 1E2$ por FTIR .....	87
Tabela 15.	Afinidade e conteúdo de estruturas secundarias dos mutantes de $\alpha 1E2$ por diversas técnicas. ....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

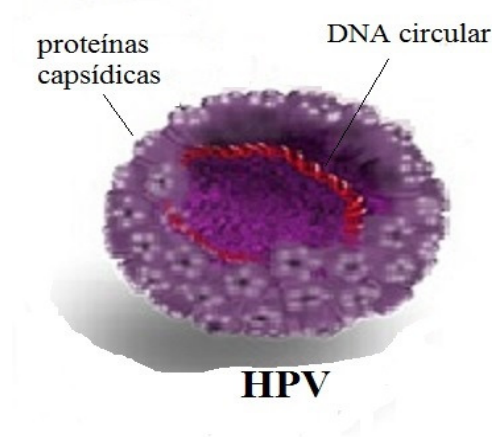
$\alpha$ 1E2	peptídeo derivado da hélice 1 da proteína E2 de HPV18
Bistris	2-Bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano
CD	<i>circular dichroism</i> – dicroísmo circular
Cys	cisteína
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
DST	doença sexualmente transmissível
DTT	ditiotretol
EDTA	etilenodiaminotetraacetato dissódico desidratado
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
HPV	papilomavirus humano
Inc	incorporated
<i>K<sub>d</sub></i>	constante de dissociação
palíndromo de DNA	ambos os filamentos de DNA possuem a mesma sequência de bases, porém com polaridades ou sentidos invertidos.
q.s.p.	quantidade suficiente para
Tp	tampão
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
<i>wt</i>	<i>wild type</i> , original, selvagem
$\lambda$ excitação	comprimento de onda de excitação
$\lambda$ emissão	comprimento de onda de emissão

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O papilomavirus

Os Papilomavirus compreendem um gênero da família *Papillomaviridae*, a qual é formada por vírus contendo uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) dupla fita circular, de  $\pm 8000$  pares de base (pb) num capsídeo icosaédrico não envelopado. Esses vírus são espécie-específicos e podem infectar diversos vertebrados (BAKER *et al.*, 1991). Por volta de 120 espécies de papilomavirus infectam seres humanos, os chamados HPV – *Human Papilloma Virus* (PANG; THIERRY, 2012). (Figura 1).

O Papilomavirus humano, ou HPV, é o vírus sexualmente transmissível mais comum no mundo. Estima-se que, por volta de 75% das mulheres e homens sexualmente ativos no mundo terão ao menos uma infecção por HPV durante suas vidas. A maioria dos que apresentarem um sistema imune saudável progredirá para cura espontânea. Enquanto que uma pequena parcela dos infectados poderá desenvolver câncer (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012; GOVERNMENT OF CANADA, 2010). Dados sobre a incidência de HPV na população brasileira não foram encontrados.



**Figura 1.** Modelo da partícula viral de HPV (adaptado de ROHL - [www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2008/illpres.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/illpres.html)).

A prevenção sugerida contra a infecção por HPV é a mesma para todas as doenças sexualmente transmissíveis (DST<sup>s</sup>): a prática de sexo seguro, que inclui o uso de preservativos e a redução do número de parceiros (GOVERNMENT OF CANADA, 2010). Porém, os preservativos não apresentam 100% de efetividade contra a infecção por esse vírus; eles apenas diminuem o risco à infecção (CENTERS FOR DESEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).



## 1.2 A INFECCÃO POR HPV

O HPV possui tropismo por células basais em proliferação de tecidos epiteliais, tais como as da pele, mucosa oral e cérvix uterina. Ele pode causar de verrugas genitais e papilomas laríngeos. Alguns subtipos de HPV estão associados ao desenvolvimento de cânceres (CHIANG *et al.*, 1992; PANG; THIERRY, 2012; ZUR HAUSEN, 2002).

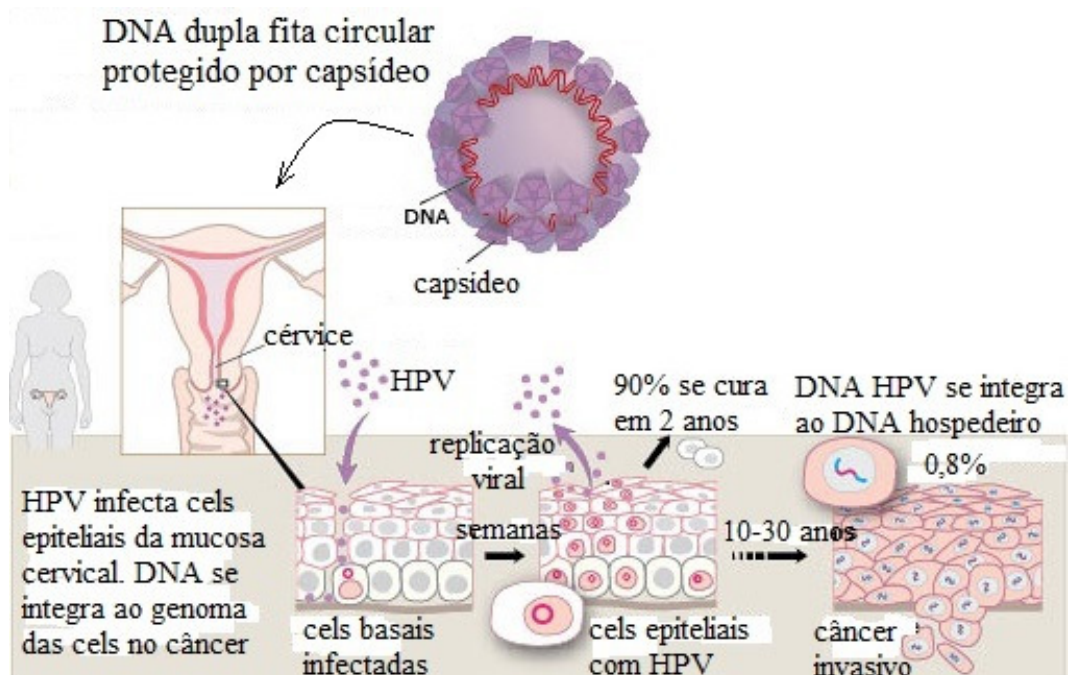
A infecção por HPV ocorre comumente durante o ato sexual, com o contato entre um tecido infectado e uma mucosa ou epitélio com micro lesões, facilitando a permeação do vírus até as células da camada basal dessa mucosa ou epitélio. O vírus, então, utiliza a maquinaria da célula hospedeira para se multiplicar (ZUR HAUSEN, 2002).

São sugeridas duas fases para replicação do DNA viral:

1ª) fase de amplificação, com produção de alta carga viral nas camadas mais superficiais do epitélio infectado;

2ª) fase de manutenção, com produção de carga viral menor na camada basal de células proliferativas.

A fase de manutenção origina o período de latência da infecção por HPV, no qual a carga viral mantém-se em níveis indetectáveis (PANG; THIERRY, 2012) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema da infecção por HPV (adaptado de ROHL - [www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2008/illpres.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/illpres.html) - acesso em 24/03/2013).

O genoma viral codifica no mínimo 6 proteínas iniciais, classificadas de *Early* (E), e 2 proteínas tardias, chamadas de *Late* (L). As proteínas E atuam na replicação do DNA viral e/ou na expressão das proteínas virais. As proteínas L formam o capsídeo viral (HEGDE, 2002), como mostrado na Figura 3.

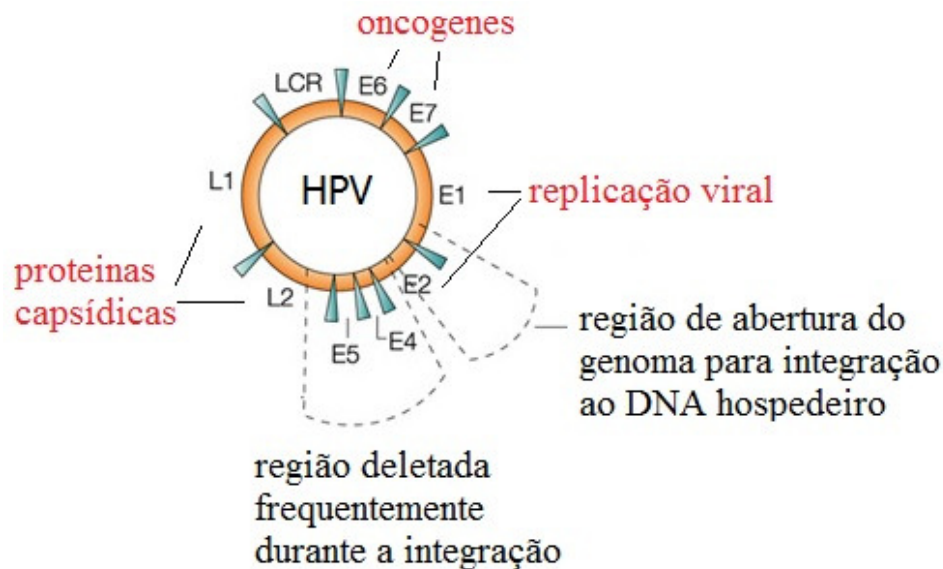


Figura 3. Esquema do genoma de HPV, mostrando a região dos genes que codificam cada uma das proteínas virais e suas respectivas funções no ciclo viral (adaptado de D'ABRAMO; ARCHAMBAULT, 2011).

As principais funções das proteínas expressas pelo HPV são descritas na Tabela 1.

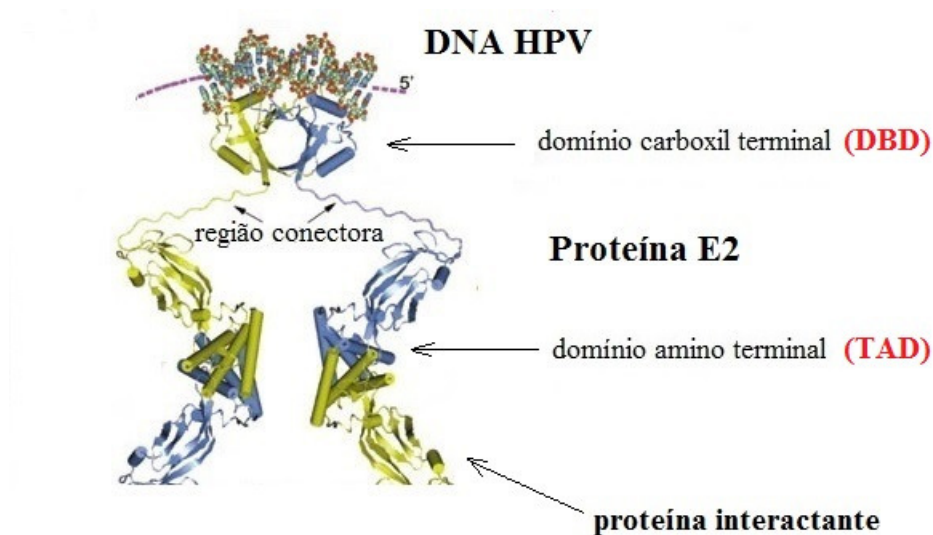
Tabela 1. Principais funções das proteínas de HPV

PROTEÍNA VIRAL	FUNÇÃO
E1	ação de helicase, envolvida na replicação viral; coativador da replicação viral, repressor da transcrição de E6 e E7;
E2	induz apoptose pela via extrínseca; induz instabilidade cromossomal, interferindo na ubiquitina ligase APC/C
E4	liga-se a proteínas do citoesqueleto, gerando desarranjo de células hospedeiras na fase G2; induz a apoptose
E5	ação pró proliferativa em alguns subtipos de HPV
E6	inibe p53 e induz telomerase, levando a imortalização celular;
E7	inibição de pRb, p107 e p130, levando a célula para a fase S; induz instabilidade cromossomal
L1	principal proteína capsídica viral
L2	proteína capsídica viral

(adaptado de PANG; THIERRY, 2012)

As proteínas E1 e E2 virais são necessárias para a replicação do DNA viral. A proteína E1 exerce a função de helicase, desenovelando uma região do DNA para que ela possa ser copiada (PANG; THIERRY, 2012).

O gene E2 de HPV pode ser traduzido em três proteínas E2 diferentes: E2-TA, E2c e E2/E8. As quais exercem funções variadas e algumas antagônicas no ciclo de vida do HPV (HUBBERT *et al.*, 1988). A proteína E2-TA, ou transativadora, ou *full-length*, consiste num domínio amino terminal transativador (TAD) e um domínio carboxil terminal de ligação ao DNA (DBD – *DNA binding domain*), interligados entre si por um domínio conector (Figura 4).



**Figura 4. Esquema dos domínios amino e carboxil terminais da proteína E2 de HPV.** A proteína E2 liga-se ao DNA na forma dimerizada, através do domínio carboxil terminal (DBD). Os dímeros são mostrados com cores diferentes para cada monômero. A proteína E2 interage com a proteína E1 através do domínio amino terminal (TAD) (ANTSON *et al.*, 2000).

A proteína E2-TA liga-se ao DNA na forma dimerizada. Nos estágios iniciais da infecção, a proteína inibe a transcrição dos oncogenes E6 e E7, através da interação do seu domínio DBD com sítios de regulação da expressão desses oncogenes no DNA viral. Além disso, a proteína E2-TA também se liga à proteína E1 através do domínio TAD, e ao DNA pelo domínio DBD. Assim, auxiliando a ação da proteína E1 por ancorá-la ao DNA (HEGDE, 2002; PANG; THIERRY, 2012).

A proteína E2 também é encontrada em formas truncadas, conhecidas como E2c e E2-E8. Na primeira, uma parte do domínio TAD está ausente. Em E2-E8, um segmento de 11 aminoácidos da região amino terminal da proteína E8 está fusionado ao domínio DBD da proteína E2. Ambas as proteínas não apresentam atividade transativadora do domínio TAD,

tornando-as proteínas **repressoras** da replicação viral (HUBBERT *et al.*, 1988; LIMA, 2004).

A expressão aumentada de E2 durante a infecção viral sugere que ela possa ser um bom alvo para novos tratamentos antivirais, assim como um biomarcador para diagnóstico de infecções recentes por HPV (PANG; THIERRY, 2012). Durante o processo de integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira e consequente malignização da célula hospedeira, há a perda da expressão da proteína E2 nessas células, acompanhada da super expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7 (HEGDE, 2002; HUBBERT *et al.*, 1988; PANG; THIERRY, 2012).

### 1.3 O HPV E O CÂNCER

Por volta de 15 subtipos de HPV são classificados como oncogênicos, ou seja; podem levar ao desenvolvimento de câncer em pessoas portadoras. Os subtipos HPV 6 e 11 são encontrados em 90% dos condilomas ano genitais (GOVERNMENT OF CANADA, 2010; HEGDE, 2002). Os subtipos 16 e 18 estão presentes em 70% dos casos de câncer cervical no mundo (MAHDAVI; MONK, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011) e os subtipos 31, 33, 35, 52 e 58 respondem por mais 15% da incidência dessa patologia (WHEELER *et al.*, 2012). De Sanjose *et al.* (2010) cita a ocorrência dos subtipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58, em 90% dos casos de câncer cervical. As infecções por esse vírus são normalmente coinfeções de diferentes subtipos (WHEELER *et al.*, 2012).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), um estudo abrangendo a população dos Estados Unidos da América (EUA), de 2004 a 2008, constatou que o vírus HPV é o agente etiológico de:

- câncer anal: 90%;
- câncer vaginal: 65%;
- câncer vulvar: 50%;
- câncer de pênis: 35%;
- cânceres orofaríngeos: 60% (mostrados por estudos mais recentes) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012)

A oncogenicidade dos diversos subtipos de HPV é relacionada ao número de promotores regulando a expressão de oncogenes: subtipos de maior virulência possuem menos promotores que subtipos de menor virulência. No câncer de colo de útero, a classificação quanto à oncogenicidade é feita conforme a Tabela 2.

**Tabela 2. Classificação quanto à oncogenicidade dos subtipos de HPV em câncer de colo de útero**

<b>ONCOGENICIDADE</b>	<b>HPV - SUBTIPO</b>
ALTO RISCO	<b>16, 18</b> , 31, 33, 39, 45 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
BAIXO RISCO	<b>6, 11</b>

(adaptado de WHEELER *et al.*, 2012).

### 1.3.2 O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

O câncer de colo de útero, ou de cérvix uterina, é o 2º tipo de câncer mais incidente entre mulheres no Brasil (9,3% ou 17.540 mulheres), atrás do câncer de mama (27,9%). Em 2010, ele foi a causa de 4.986 mortes femininas (INCA, 2012b).

As abordagens preventivas contra o câncer de colo de útero incluem o sexo seguro e as vacinas profiláticas. Essas vacinas consistem em proteínas recombinantes da principal proteína do capsídeo viral (L1) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Em junho de 2006, a vacina profilática quadrivalente Gardasil®, do laboratório Merck, contra os subtipos de HPV 6, 11, 16 e 18, foi licenciada nos EUA para uso em mulheres e homens de 9 a 26 anos. Em outubro de 2009, a vacina profilática bivalente do laboratório Glaxo Smithkline, Cervarix®, contra os HPVs 16 e 18, foi autorizada nos EUA para uso em mulheres de 10 a 25 anos. A efetividade estimada para ambas as vacinas foi superior a 90% na prevenção de câncer cervical quando a vacinação ocorre antes do início da vida sexual (LEHTINEN *et al.*, 2012; VELDE *et al.*, 2012; WHEELER *et al.*, 2012). Estudos mostraram que a vacina bivalente apresentou proteção cruzada contra os subtipos HPV 33, 41, 45 e 51 (WHEELER *et al.*, 2012). Uma nova vacina profilática nonavalente, contra os subtipos 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, 6, e 11, está ainda em teste (DE SANJOSE *et al.*, 2010). No Brasil, foi aprovada a inclusão da vacina tetravalente contra o HPV no calendário do Programa Nacional de

Imunizações do Sistema Único de Saúde (SUS) a partir do ano de 2014 para meninas de 11 a 13 anos e, a partir de 2015 para meninas de 9 a 11 anos também (REIS, 2013). Apesar das vacinas profiláticas comercialmente disponíveis possuírem alta efetividade e segurança, elas não possuem ação contra infecções ou câncer já estabelecidos (PANG; THIERRY, 2012).

O diagnóstico precoce de câncer de colo de útero pode ser feito através do exame ginecológico preventivo – o teste de *Papanicolaou* (GOVERNMENT OF CANADA, 2010; INCA, 2012a).

Os tratamentos para o câncer de colo de útero podem ser: cirúrgico, radioterápico, quimioterápico, além de combinações desses, de acordo com o estadiamento da doença (COUTINHO *et al.*, 2011; INCA, 2012a). Os tratamentos possuem uma efetividade por volta de 90%, porém tem consideráveis mortalidade, custo e recidiva (BELL; ALVAREZ, 2005; MAHDAVI; MONK, 2005).

Vacinas terapêuticas que indiquem as células tumorais ao sistema imune do hospedeiro vem sendo estudadas. Elas podem ser vacinas de: peptídeos; DNA; vetores virais, entre outras (BELL; ALVAREZ, 2005).

## 1.4 O RECONHECIMENTO NUCLEICO

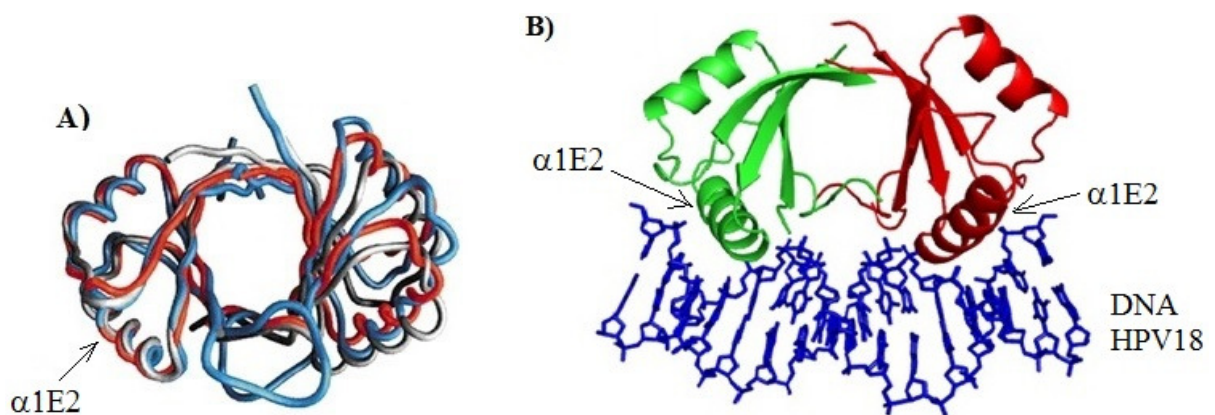
A interação DNA-proteínas envolve o reconhecimento de regiões alvo do DNA, chamadas de *Região de reconhecimento*, através de interações do tipo ligações de hidrogênio, de van der Waals e eletrostáticas; além da complementariedade de superfícies e capacidade de rearranjo conformacional de ambas as macromoléculas durante a complexação (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006; MULÉ, 2009). Foi sugerido que o reconhecimento nucléico seguiria um código, com preferências de aminoácidos para cada nucleotídeo (LUSCOMBE; LASKOWSKI; THORNTON, 2001; SEEMAN; ROSENBERG; RICH, 1976). Desde então, diversas metodologias vem sendo desenvolvidas visando o manejo do DNA, como as técnicas de engenharia genética de proteínas com dedos de zinco - *artificial zinc fingers* - desde os anos 90 (KIM, S.-S. *et al.*, 2000; KIM, Y. *et al.*, 2012; MINO *et al.*, 2008; SERA; URANGA, 2002; SERA, 2005; WU; KANDAVELOU; CHANDRASEGARAN, 2007); ou efetores semelhantes a ativadores de transcrição – *Transcription activator-like effector*, desde 2010 (CLARK; VOYTAS; EKKER, 2011; DOYLE *et al.*, 2012). Nessas técnicas, são propostas proteínas elaboradas com base em um

código de reconhecimento nucléico, as quais podem reconhecer sequências alvo no DNA desejado, ancorando-se a ele por meio de interações com essas sequências alvo. O ancoramento da proteína ao DNA alvo pode ser usado para bloquear sítios do DNA de ligação de proteínas promotoras da replicação viral, ou para ancorar outras proteínas, como nucleases, ao DNA, a fim de clivá-lo em regiões específicas, promovendo a deleção ou inserção de genes. As aplicabilidades de tais técnicas são variadas, desde o tratamento de doenças genéticas ou virais, a produção de biomarcadores para testes diagnósticos tanto para humanos quanto na agricultura, assim como a manipulação genética de descendentes e o melhoramento de desempenho de atletas (BOCH *et al.*, 2009; CARLSON; FAHRENKRUG; HACKETT, 2012; CLARK; VOYTAS; EKKER, 2011; DOYLE *et al.*, 2012; IUCHI; KULDELL, 2005; MA *et al.*, 2012). Entretanto, a produção dessas proteínas é difícil e sua efetividade ainda é baixa (CLARK; VOYTAS; EKKER, 2011).

#### 1.4.1 ANÁLOGOS DE $\alpha$ 1E2

A estrutura da E2c, como observada primeiramente por Hegde *et al.* (1992), apresenta um motivo completamente novo de dimerização e ligação a DNA por proteínas, nunca visto até então para fatores transcricionais eucarióticos (Figura 5A). A estrutura consiste em um homo dímero, cuja interface de dimerização é formada por “barril” folha beta (folha  $\beta$ ), sendo que cada monômero apresenta metade desse “barril”. A interação com o DNA é dada pela inserção de uma alfa-hélice ( $\alpha$ -hélice), por monômero de E2c, na cavidade maior do DNA, onde estão localizadas as bases ACCG-NNNN-CGGT (palíndromo) responsáveis pela especificidade de ligação, onde N pode ser qualquer nucleotídeo (Figura 5B). A hélice de cada monômero faz contato direto tanto com as bases do DNA, por ligações de hidrogênio, quanto por interações iônicas (ligações salinas) e moléculas de água. Existe ainda outra região de contato da proteína com o DNA, pouco estruturada, que une duas folhas  $\beta$ . Esta região, segundo os estudos estruturais por RMN de Liang *et al.* (1996), é extremamente flexível. Seus estudos de troca H-D demonstraram que a hélice de reconhecimento de DNA da E2c também possui elevada flexibilidade, possivelmente em equilíbrio transiente entre a conformação helicoidal e a parcial ou localmente desenovelada. O dímero forma um barril de folhas  $\beta$ , com cada subunidade formada por quatro folhas antiparalelas e duas  $\alpha$ -hélices alinhadas perpendiculares ao barril, contribuindo com meio barril. A topologia de cada subunidade é

$\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ . A  $\alpha$ -hélice 1 é a hélice de reconhecimento ao DNA onde está localizada a maioria dos aminoácidos envolvidos no contato direto e específico com o DNA. Nas estruturas de HPV complexado à proteína E2c em solução, as hélices da proteína apresentam uma mobilidade que pode ser importante para o reconhecimento e ligação ao DNA (HEDGE, 2002). A sequência de aminoácidos do DBD da proteína E2 é bem conservada, variando de 54% de identidade (77% de similaridade) entre os tipos mais relacionados - HPV16 e HPV18 - a 33% de identidade (51% de similaridade) entre os tipos mais distantes - HPV16 e BPV1 (HEDGE, 2002). A maior conservação é vista nos resíduos que formam a hélice de reconhecimento e a interface do dímero. (Figuras 5 e 6).



**Figura 5. Domínio de ligação da proteína E2 de papilomavirus a DNA.** A) Superposição das estruturas de E2c, livres, de HPV-16 (vermelho), HPV-31 (azul) e BPV-1 (cinza), mostrando a semelhança entre a região DBD das proteínas E2 de diferentes subtipos de HPV (adaptado de Hegde e Androphy, 1998). B) Ligação de E2c ao DNA HPV18 (1JJ4.pdb).

	340	350
HPV33	GESNSLKCLRYRLKPYK-	
HPV31	GDANILKCLRYRLSKYK-	
HPV18	GDRNSLKCLRYRLRKHS-	
HPV16	GDANTLKCLRYRPFKKHC-	
HPV11	GDSNCLKCFRYRLNDKYK	
HPV6B	GESNCLKCFRYRLNDRHR	
HPV8	GEANTLKCFRNRARVRYR	
HPV5	GAANTLKNVRNRAKIKYM	
HPV1A	GGANQLKCLRYRLKASTQ	
CRPV	GGHNQLKCLRYRLKSKHS	
BPV4	GGANTLKCFRRRATQHP	
EEPV	GNGNQAKCYRFRCKRYFR	
DPV	GTGNQVKCYSFRVKRWHR	
BPV1	GTANQVKCYRFRVKKNHR	

**Figura 6. Alinhamento da sequência primária de  $\alpha 1E2$  de diferentes papilomavirus.** Em destaque são mostrados os subtipos mais relacionados ao câncer de colo de útero (HPV16 e 18) e às verrugas e condilomas (HPV6 e 11). Os aminoácidos grifados interagem diretamente com o DNA de HPV (MC BRIDE; MYERS).



Observou-se que um peptídeo derivado da hélice 1 da proteína E2 ( $\alpha 1E2$ ) de HPV16, correspondente à região de reconhecimento de uma sequência palíndromo ACCG-NNNN-CGGT do DNA pela proteína E2, foi capaz de ligar-se ao seu DNA alvo (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006). Apesar de não possuir estrutura secundária organizada quando em solução, a interação com o DNA levou à mudança conformacional do peptídeo para uma estrutura enovelada, indicando que não seria necessária a presença da proteína E2 inteira para haver a ligação da hélice  $\alpha 1E2$  com o DNA, mas que grande parte da especificidade de E2 seria devida à sequência peptídica da hélice. Além disso, a ligação peptídeo – DNA, pela ausência do domínio transativador, poderia inibir a replicação viral, semelhante à ocorrida com a proteína E2c. Porém, a afinidade desse peptídeo pelo seu DNA consenso foi cerca de 100 vezes menor que a afinidade da proteína E2c dimérica, com a constante de dissociação passando de  $\sim 10\text{nM}$ , no caso da proteína E2c, para  $\sim 1\text{mM}$ , no caso do peptídeo  $\alpha 1E2$  (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006).

Diversos grupos de pesquisa no país e no mundo têm voltado suas atenções para peptídeos bioativos, visando como alvos proteínas e o sistema imune. Outra abordagem terapêutica são os ácidos nucleicos (NA). Os NA tem sido objeto de interesse tanto acadêmico quanto industrial-farmacêutico no planejamento de ligantes, como RNA de interferência, peptídeos-ácidos nucleicos e pequenas moléculas. Entretanto, o emprego de peptídeo tão somente como agente regulatório por interação com NA tem sido pouco estudado na literatura, salvo por proteínas maiores baseadas em dedos de Zinco (*Zinc Fingers*) por meio de terapia gênica. A modulação de NA por peptídeos nativos, ou derivatizados, ou modificados (D-aa, beta-aa) pode ser possível, o que geraria uma nova vertente nessa área.

Pesquisas anteriores do grupo do laboratório *pbiotech*, da UFRJ, demonstraram que o fragmento peptídico  $\alpha 1E2$  é capaz de reconhecer especificamente o domínio cognato de ligação a DNA de E2c (sequência palíndromo ACCG-NNNN-CGGT)(FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006; GIESEL *et al.*, 2008; LIMA, 2004). Foram avaliados pequenos peptídeos desenhados a partir da sequência nativa de E2 de HPV16, sem otimização de afinidade ou parâmetros de biodisponibilidade. A presente proposta visa aprofundar as investigações desenvolvidas nos últimos anos voltadas ao planejamento, desenvolvimento e caracterização de inibidores da interação entre a proteína E2 e DNA específico. A perturbação dessa interação foi validada na literatura internacional como um alvo terapêutico contra o desenvolvimento da infecção e/ou malignização de células hospedeiras pelo HPV.

Peptídeos que mimetizassem a interação entre a proteína E2 e seu DNA consenso, sem ligarem-se à proteína E1 poderiam inibir a replicação viral, pela ausência de ancoramento da proteína E1 ao mesmo DNA, além de inibir a expressão das proteínas virais oncogênicas E6 e E7. Tais peptídeos poderiam ser utilizados como biofármacos no tratamento contra infecções benignas e/ou desenvolvimento de neoplasias relacionadas ao HPV. Visto que medidas profiláticas como os preservativos apenas diminuem o risco à contaminação por HPV; a diminuição do número de parceiros sexuais envolve hábitos socio-econômico-culturais e educação sexual; além das vacinas bivalente ou tetravalente não serem disponibilizadas a toda a população independente da faixa etária e gênero, pesquisas sobre novos tratamentos, preferencialmente menos agressivos ou tóxicos, são extremamente importantes no manejo dessa infecção considerada a mais incidente doença sexualmente transmissível no mundo, que ainda possui envolvimento com diversos tipos de cânceres.

Nessa proposta de projeto de Mestrado pretende-se estender a caracterização iniciada pelo grupo do laboratório *pbio* na interação entre a hélice de reconhecimento nucléico da proteína E2 de papilomavirus ( $\alpha$ 1E2) e DNA.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Aprofundar os estudos sobre a interação da hélice 1 da proteína E2 e o DNA de HPV18, na busca do desenvolvimento de um possível biofármaco contra a infecção por HPV.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Planejar uma série de peptídeos análogos a  $\alpha$ 1E2 de HPV18;
- Realizar avaliação estrutural por conteúdo de estrutura secundária dos peptídeos em fase sólida e em solução;
- Realizar avaliação funcional por medidas de afinidade e especificidade dos análogos a  $\alpha$ 1E2 propostos frente a DNA específico e não específico;
- Estudar correlação estrutura-função para a série de peptídeos estudados;
- Estabilizar o peptídeo  $\alpha$ 1E2 na forma de  $\alpha$ -hélice, através das mutações na sequência primária propostas nos peptídeos desenvolvidos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados nos experimentos realizados eram de elevado grau de pureza. Foi utilizada água tipo 1 obtida por ultra purificação de água destilada em sistema MilliQ Academic (Millipore) recentemente obtida. As soluções tampão foram preparadas para uso imediato e tiveram seu pH verificado e ajustado para 7.0.

#### 3.1 PEPTÍDEOS E DNAs

As sequencias de aminoácidos correspondentes aos peptídeos planejados foram sintetizadas por fase sólida Fmoc e purificadas pela empresa GenScript USA Inc. Suas pureza e massas molares foram verificadas por C18-HPLC e ESI-MS pelo próprio fabricante, sem averiguação posterior da identidade. Os peptídeos foram recebidos na forma de pó, em alíquotas de 4 a 6 mg, sob refrigeração, e armazenados a -20°C tanto na forma sólida quanto ressuspensos em água para uso posterior. Durante os experimentos, as alíquotas ou soluções elaboradas a partir delas foram mantidas sob refrigeração.

Como **DNA específico**, foi utilizada a sequência de oligonucleotídeo de HPV18 abaixo, ligada à 5´6-Carboxifluoresceína (5´6-FAM; mistura de isômeros 5 e 6- FAM) como cromóforo, encomendada à empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT):

(5' 6-FAM)-5'-GTA **ACCG** AAAT **CGGT** TGA-3'  
3'-CAT **TGGC** TTTA **GCCA** ACT -5'

O DNA específico foi enviado pela empresa IDT na forma de fita simples em dois frascos, contendo cada frasco a fita senso ou antisenso. Os frascos foram centrifugados, seguindo-se da adição de solução tampão em volume suficiente para gerar soluções equimolares. A composição da solução tampão foi:

- NaCl a 150 mM;
- Tris.HCl a 200 mM;
- EDTA a 200 mM
- Água tipo 1 q.s.p. (pH 7,0)

As soluções das fitas de DNA foram aquecidas a ~ 40 °C por 5 minutos, misturadas, homogeneizadas e aquecidas em banho maria até 90 °C. Retirou-se do aquecimento o banho maria contendo o frasco com o DNA e deixou-se o sistema resfriar à temperatura ambiente gradualmente, envolvido em papel alumínio. Após resfriamento, o frasco com DNA anelado foi congelado a -20 °C, até o momento de uso.

Como **DNAs não específicos**, foram utilizadas duas sequências de oligonucleotídeos - (A) um oligonucleotídeo poli(CG), bem diferente do DNA específico utilizado nesse estudo; e (B) um oligonucleotídeo semelhante ao DNA específico, mas com as bases nitrogenadas da sequência palíndromo alteradas. O DNA não específico A foi cedido pelo laboratório *Labime*, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e era ligado à Carboxitetrametilrodamina (TAMRA) como cromóforo. O DNA não específico B foi adquirido junto à empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT) e possuía Fluoresceína (FAM) como cromóforo, assim como o DNA específico.

#### **DNA não específico A:**

(5'-TAMRA)- 5'- AAA **GGAC GCGC GCGC** GCC TTA – 3'  
3'- TTT **CCTG CGCG CGCG** CGG AAT – 5'

#### **DNA não específico B:**

(5' 6-FAM)-5'-GTA **CAGC AAAT GCCA** TGA-3'  
3'-CAT **GTCG TTTA CGGT** ACT -5'

A afinidade dos peptídeos análogos à  $\alpha$ 1E2 por DNA de HPV foi investigada por meio de titulações dos peptídeos frente a um oligonucleotídeo genérico de HPV. Tal oligonucleotídeo representa a sequência palíndromo onde a proteína E2 viral se liga (ACCG – 4bases – CGGT), com a sequência de 4 bases no meio do palíndromo - sequência espaçadora sendo as bases AAAT. A sequência espaçadora rica em Adenina (A) e Timina (T) torna o DNA mais rígido, o que aumenta a sua afinidade pela proteína E2 viral, no caso de vários subtipos de HPV, como HPV16 e 18 (HINES *et al.*, 1998). Assim, objetiva-se desenvolver

peptídeos que tenham afinidade por DNA de qualquer subtipo de HPV, ou do maior número possível.

A seletividade dos peptídeos foi avaliada por meio de titulações dos mesmos contra um DNA não específico semelhante ao DNA específico utilizado, porém sem a sequência palíndromo, e contra um DNA não específico distinto da região de ligação da proteína E2 ao DNA de HPV. Os resultados das titulações de cada peptídeo contra os DNAs específico e não específico foram então comparados.

A estrutura secundária dos peptídeos foi investigada por Dicroísmo Circular (CD).

### 3.2 ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA

Medidas de Anisotropia podem fornecer informações sobre tamanho e forma de proteínas ou outras substâncias. A anisotropia se baseia na excitação fotosselativa de compostos fluorescentes (fluoróforos) pela luz polarizada. Com a absorção de fótons dessa luz polarizada que tenham seu vetor elétrico alinhado paralelamente ao do fluoróforo. Num meio isotrópico, as moléculas de fluoróforo encontram-se orientadas randomicamente. Incidindo-se um feixe de luz polarizada, as moléculas que tiverem seus momentos dipolos orientados paralelamente ao vetor elétrico do feixe incidente serão excitadas. Gerando uma população de moléculas orientadas paralelamente ao feixe incidente. Conseqüentemente, a emissão da luz absorvida pelo meio também ocorrerá de forma parcialmente polarizada.

A equação da Anisotropia é:

$$r = \frac{(I_{\parallel} - I_{\perp})}{(I_{\parallel} + 2I_{\perp})} \quad [1]$$

sendo  $I_{\parallel}$  e  $I_{\perp}$  as intensidades de emissão de fluorescência paralela e perpendicular, respectivamente, considerando a excitação da amostra com luz polarizada verticalmente (LAKOWICZ, 2006).

O ângulo relativo ao deslocamento do vetor elétrico do fluoróforo entre a sua excitação e a emissão corresponde ao máximo valor da anisotropia. Em solução, a maioria dos fluoróforos gira várias vezes durante um intervalo de 50 a 100 picossegundos (ps). Na escala de nanossegundos (ns), que corresponde à meia vida ( $t_{1/2}$ ) de vários fluoróforos, esses podem

rotacionar tantas vezes que a solução resultante terá orientação randômica. Ou seja; anisotropia tendendo a zero. Qualquer fator que interfira na velocidade de rotação do fluoróforo, como a ligação a outra molécula, poderá afetar a sua anisotropia. Podendo essa técnica ser utilizada para investigar a interação entre um fluoróforo e outra molécula, ou duas moléculas, quando uma delas está ligada a um fluoróforo (LAKOWICZ, 2006). No presente trabalho, as medidas de anisotropia foram utilizadas para investigar a afinidade e a especificidade entre os peptídeos análogos a  $\alpha$ 1E2 propostos e DNA de HPV. Para isso, foram realizadas titulações dos peptídeos contra DNA específico ou não específico, marcado com um fluoróforo.

Os ensaios de afinidade dos peptídeos frente a DNA específico ou não específico foram processados através do programa *Sigmaplot*, versão 12.0 (Systat Software, San Jose, CA). As curvas obtidas foram fitadas através da equação abaixo, correspondente ao formalismo de Hill, como descrito previamente na literatura (LIMA, 2001).

$$r = r_i + (r_f - r_i) * \frac{([L]^n/Kd^n)}{1+([L]^n/Kd^n)} \quad [2]$$

onde  $r_i$  e  $r_f$  são os valores de anisotropia nos pontos inicial e final, respectivamente.  $[L]$  corresponde a concentração do ligante,  $Kd$  a constante de dissociação aparente da reação e  $n$  o coeficiente de cooperatividade de Hill.

Os valores de  $Kd$  das curvas de afinidade de todos os peptídeos frente a DNA específico, nas condições otimizadas de meio reacional para cada peptídeo, foram analisados estatisticamente através do **teste paramétrico t, não pareado, bicaudal**, onde as  $Kd$  dos peptídeos foram comparadas com as respectivas  $Kd$  de  $\alpha$ 1E2a, considerado como referencial nesse estudo. O testes estatístico foi processado no programa *Sigmaplot*, versão 12.0 (Systat Software, San Jose, CA). As  $Kd$  foram consideradas estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ , utilizando-se um asterisco (\*) como símbolo nos gráficos e tabelas gerados.

### 3.2.1 PARAMETRIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA LEITURA DE ANISOTROPIA COM DNA ESPECÍFICO E NÃO ESPECÍFICO

Os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de excitação e emissão a serem considerados para os experimentos de anisotropia foram determinados tomando-se uma solução de 200 $\mu$ L de DNA a 50 $\mu$ M – específico ou não - em tampão Bistris pH 7.0. Utilizou-se um espectrofluorímetro JASCO FP-6300, o programa *Spectra Manager for Windows*, versão 1.05.03 (build 1) e cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

As medidas de fluorescência da solução de DNA foram realizadas, levando-se em conta os  $\lambda$  de máxima excitação ou emissão descritos na literatura (INVITROGEN, 2005, p.58). A otimização dos  $\lambda$  de excitação e emissão a serem utilizados nos experimentos de anisotropia foi feita por varredura do  $\lambda$  de excitação ou emissão. A faixa de  $\lambda$  considerada para a varredura foi uma faixa ampla que cruzasse o valor preconizado pela literatura como o  $\lambda$  de máxima excitação ou emissão. Durante a otimização do  $\lambda$  de excitação, o  $\lambda$  de emissão foi mantido fixo num valor aproximado ao  $\lambda$  de máxima emissão preconizado pela literatura. Da mesma forma, durante a pesquisa da emissão do fluoróforo, o  $\lambda$  de excitação foi fixado num valor aproximando ao  $\lambda$  de máxima excitação, segundo a literatura. Assim, foram utilizados os valores descritos nas Tabelas 3 e 4.

#### a) DNA ESPECÍFICO: (5' 6-FAM)-DNA HPV18

**Tabela 3. Parâmetros para leituras de anisotropia do DNA específico no espectrofluorímetro JASCO FP-6300**

PARÂMETROS	EXCITAÇÃO	EMIÇÃO
$\lambda_{\text{max\_literatura}}$	494 nm	518 nm
$\lambda_{\text{varredura}}$	450 – 500 nm	510 – 620 nm
$\lambda$	emissão = 520 nm	excitação = 490 nm

Sendo  $\lambda$  o comprimento de onda, e os valores de  $\lambda_{\text{max\_literatura}}$  seguem o *Guia para Sondas Fluorescentes e Tecnologias de Marcação*, do laboratório *Invitrogen* (INVITROGEN, 2005, p.58).



**b) DNA NÃO ESPECÍFICO A: (5' TAMRA)-poli(CG)**

**Tabela 4. Parâmetros para leituras de anisotropia do DNA não específico no espectrofluorímetro JASCO FP-6300**

PARÂMETROS	EXCITAÇÃO	EMISSÃO
$\lambda_{\text{max\_literatura}}$	555 nm	580nm
$\lambda_{\text{varredura}}$	450 – 565 nm	565 - 650nm
$\lambda$	emissão = 580 nm	excitação = 555 nm
Abertura de banda	20 nm	20 nm

As soluções de DNA acima foram transferidas para uma placa de pesquisa da marca Costar, de 96 poços de fundo reto, de poliestireno preto, não tratada e não estéril (nº referência 3915 - Corning Incorporated, EUA), e feitas leituras de anisotropia no espectrofluorímetro SPECTRAMAX M5, programa *Softmax Pro*, versão 5.4, com os parâmetros da Tabela 5.

**Tabela 5. Parâmetros para leituras de anisotropia no SPECTRAMAX M5**

PARÂMETROS	DNA ESPECÍFICO	DNA NÃO ESPECÍFICO
$\lambda_{\text{excitação}}$	450, 460, 470, 480, 490 nm	544, 550, 555, 557 nm
$\lambda_{\text{emissão}}$	520 nm	580, 590 nm
Sensibilidade	Média	alta
Cutoff	515 nm	590 nm
Automix	após 5 segundos	após 5 segundos

Os ensaios com o DNA não específico B foram realizados nas mesmas condições dos ensaios com o DNA específico, visto os dois DNAs estarem ligados à fluoresceína (FAM) como cromóforo.

### 3.3 ENSAIO DE ISOTERMA DE LIGAÇÃO PEPTÍDEO-DNA

Os ensaios de ligação peptídeo-DNA foram realizados em soluções tampão contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), para aumentar a força iônica do meio reacional e minimizar a contribuição das interações inespecíficas entre o DNA e o peptídeo nas medidas de afinidade e seletividade realizadas (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006). O reagente cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) foi adicionado ao meio reacional para promover a coordenação intramolecular de resíduos de Histidinas (His) do peptídeo.

As soluções de DNA específico ou não específico utilizadas nas titulações continham:

- BisTris a 10 mM, pH 7.0;
- DNA a 50 nM;
- Água Tipo 1 q.s.p.

As soluções estoques dos peptídeos com Ligação dissulfeto ou sem cisteína (Cys) na sua sequência primária continham o peptídeo a 2 mM em água tipo 1. Os peptídeos com uma Cys na sequência primária foram estocados em soluções com 10 mM de DTT, além do próprio peptídeo a 2mM em água tipo 1.

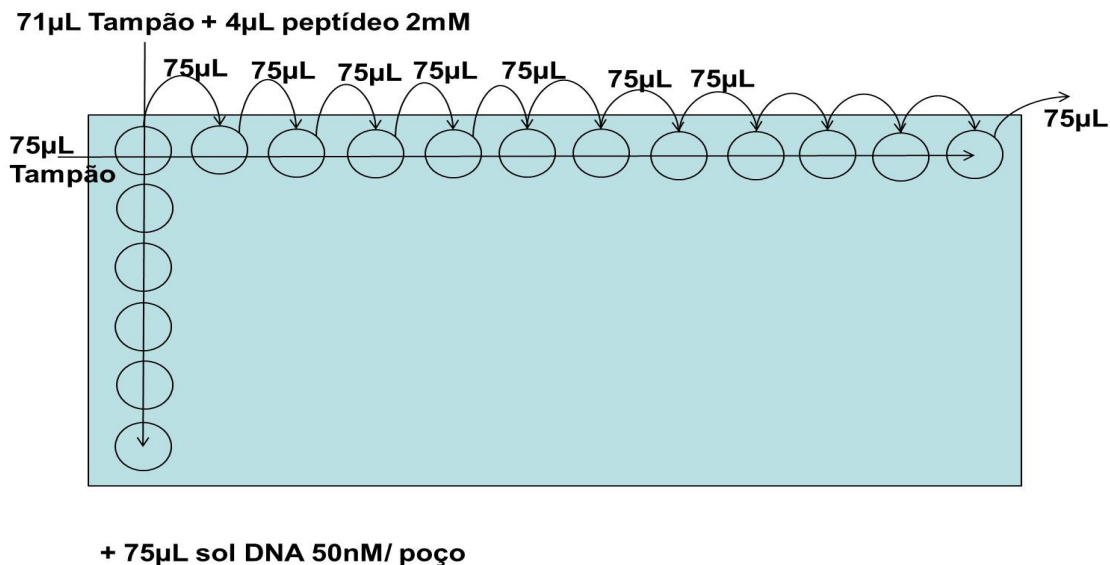
Foram também preparadas soluções tampão de BisTris a 10 mM, pH 7.0, contendo os reagentes abaixo:

- DTT a 0 ou 2 mM;
- NaCl a 0, 10, 20, 50 ou 100 mM;
- $ZnCl_2$  a 0 ou 100  $\mu$ M;
- Água Tipo 1 q.s.p.

Os peptídeos que possuíam apenas 1 resíduo de Cys foram titulados utilizando as soluções tampão descritas acima contendo DTT a 2mM e os demais reagentes em cada uma das concentrações citadas. Os peptídeos com uma Ligação dissulfeto ou sem resíduos de Cys foram titulados nas soluções tampão acima contendo cada reagente em cada concentração descrita.

As titulações seriadas foram realizadas em placas de pesquisa da marca *Costar*, de 96 poços de fundo reto (8 linhas x 12 colunas), de poliestireno preto, não tratadas e não estéreis (nº referência 3915 - *Corning Incorporated*, EUA), conforme esquema seguinte:

- 75  $\mu\text{L}$  de solução tampão foram adicionados aos 12 poços de uma linha da placa. Cada linha foi utilizada para titulação em uma condição de tampão ou peptídeo diferente;
- 71  $\mu\text{L}$  da mesma solução tampão foram adicionados apenas ao 1º poço da linha, acrescentando-se 4  $\mu\text{L}$  de solução do peptídeo a ser titulado;
- Após homogeneização dos 150  $\mu\text{L}$  da solução contida nesse 1º poço, metade do volume - 75  $\mu\text{L}$  - foi retirado e adicionado ao poço seguinte, na mesma linha. Seguida nova homogeneização da solução do 2º poço, retirada de 75  $\mu\text{L}$  dessa solução e adição desse volume ao poço seguinte. Repetindo-se tal procedimento até o 12º poço da linha, quando, após homogeneização da solução, 75  $\mu\text{L}$  foram retirados e desprezados. Ficando todos os poços com igual volume, de 75  $\mu\text{L}$  de solução tampão com o peptídeo em diluição seriada.
- Foram, então, adicionados 75  $\mu\text{L}$  de solução de DNA a cada poço sendo utilizado na placa (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de preparação da placa de 96 poços para experimentos de anisotropia por titulação seriada do peptídeo.

Pela adição de 75  $\mu\text{L}$  de solução de DNA diluir pela metade a concentração dos compostos da solução tampão, e para utilizar a mesma solução de DNA para diversas condições testadas, os solutos NaCl, ZnCl<sub>2</sub> e DTT foram adicionados apenas às soluções tampão e no dobro da concentração desejada no meio reacional.

Assim, o meio reacional das titulações seriadas apresentava:

- BisTris a 10 mM, pH 7.0;
- DTT a 0 ou 1 mM;
- NaCl a 0, 5, 10, 25 ou 50 mM;
- ZnCl<sub>2</sub> a 0 ou 50 mM;
- DNA a 25 nM.

A leitura da anisotropia das soluções contidas na placa preparada acima foi realizada no espectrofluorímetro SPECTRAMAX M5 (*Molecular Devices*), através dos parâmetros da Tabela 6.

**Tabela 6. Parâmetros para leituras de anisotropia no espectrofluorímetro SPECTRAMAX M5**

<b>PARÂMETROS</b>	<b>DNA ESPECÍFICO</b>	<b>DNA NÃO ESPECÍFICO A</b>
$\lambda_{\text{excitação}}$	460, 470, 480 ou 490 nm	550 nm
$\lambda_{\text{emissão}}$	520 nm	590 nm
Sensibilidade	média	alta
Cutoff	515 nm	590 nm
Automix	após 5 segundos	após 5 segundos

### 3.4 ESTEQUIOMETRIA DA LIGAÇÃO

Para investigação da estequiometria da ligação entre o DNA específico e cada peptídeo foram preparadas as soluções abaixo:

Solução de peptídeo ( $\alpha$ 1E2b a  $\alpha$ 1E2i):

- peptídeo a 20  $\mu$ M;
- água Tipo 1 q.s.p. 20  $\mu$ L.

Solução de peptídeo  $\alpha$ 1E2a ou  $\alpha$ 1E2j:

- peptídeo a 20  $\mu$ M;
- DTT a 1mM;
- água Tipo 1 q.s.p. 20  $\mu$ L.

Solução de DNA específico:

- (5' 6-FAM)-DNA a 25 nM;
- DNA específico sem fluoresceína a 5  $\mu$ M;
- Bistris a 10 mM;
- NaCl a 5 mM;
- água Tipo 1 q.s.p.

Em uma placa de pesquisa da marca *Costar*, de 96 poços de fundo reto, de poliestireno preto, não tratada e não estéril, foram adicionados 150  $\mu$ L de solução DNA a um poço da placa e verificada a anisotropia da solução, segundo os mesmos parâmetros mostrados na Tabela 6. Alíquotas de 1  $\mu$ L da solução de peptídeo foram acrescentadas ao poço, seguidas de homogeneização e leitura da anisotropia da solução formada no poço a cada  $\mu$ L adicionado.

Todos os ensaios e leituras foram realizados em duplicata.

### **3.5 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR**

Dicroísmo circular (*Circular Dichroism* - CD) é definido como a diferença de absorção da luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita (GREENFIELD, 2007). Um feixe de luz polarizada, ao passar por prismas ou filtros, adquire uma oscilação sinusóide em um plano. Essa onda sinusóide pode ser vista como a resultante de dois vetores de igual comprimento, um com trajetória sinusóide para a esquerda e outro para a direita. Sendo que os dois vetores estão defasados entre si de 90°, ou seja; fora de fase. Quando a onda sinusóide encontra uma molécula assimétrica, essa absorve em quantidades diferentes a luz polarizada para a esquerda da luz polarizada para a direita. Com isso, o plano da onda sinusóide é rotacionado, gerando um feixe de luz elipticamente polarizado (GREENFIELD, 2007).

Biopolímeros, como as proteínas e DNA, são macromoléculas assimétricas. Ao incidir uma onda sinusóide sobre uma solução contendo proteínas ou peptídeos, há absorção de energia dependente da rotação da molécula, ou seja; dos ângulos das ligações peptídicas e conseqüentemente da sua estrutura secundária. Traçando-se a absorção ao longo de uma faixa de comprimentos de onda, tem-se o perfil de absorção da molécula assimétrica no intervalo considerado. Podendo-se investigar a sua estrutura secundária, entre outras características (GREENFIELD, 2007; VAN HOLD; JOHNSON; HO, 1998). Realiza-se investigação do espectro de absorção no ultravioleta (UV) distante, de 260-190 nm. Estruturas em  $\alpha$ -hélice apresentam banda positiva a 193 nm e negativas a 222 e 208 nm. Estruturas em folhas beta antiparalelas são caracterizadas por bandas: negativa a 218 nm e positiva a 195 nm. Estruturas desordenadas possuem uma banda negativa a 195 nm e valores pequenos de elipticidade acima de 210 nm (GREENFIELD, 2007).

Foram feitos experimentos de CD dos 10 peptídeos propostos nesse trabalho, em cubetas de quartzo de 1 mm de caminho óptico, utilizando o espectropolarímetro JASCO J-715 e programa *Spectra Manager for Windows 95/NT*, versão 1.07.00. Foram elaboradas amostras de cada peptídeo, contendo o peptídeo a 50  $\mu$ M em solução tampão Bistris a 10 mM e pH 7.0. Às amostras dos peptídeos  $\alpha$ 1E2a e  $\alpha$ 1E2j foram adicionados DTT a 1 mM como agente redutor. Foram feitas leituras da solução tampão de Bistris antes se de adicionar o peptídeo, para correção da linha de base, eliminando-se a contribuição do tampão aos resultados obtidos.

As leituras das soluções dos peptídeos por CD foram realizadas utilizando-se varredura de  $\lambda$  de 260-190 nm; abertura de banda de 0,2 nm; velocidade de leitura de 50 nm/min. Os resultados obtidos representaram a média de 5 acumulações de leituras.

Os valores de elipticidade informados pelo equipamento para cada peptídeo foram descontados dos valores obtidos para as soluções tampão utilizadas. Após isso, os dados foram transformados para elipticidade molar -  $[\Theta]$  - em  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ , através da fórmula abaixo:

$$[\Theta] = \frac{mdeg}{l * C * n} \quad [3]$$

sendo: *mdeg* = elipticidade em miligráus; *l* = caminho óptico em milímetros; *C* = concentração molar do peptídeo; *n* = o número de resíduos de aminoácidos do peptídeo (GREENFIELD, 2007). Utilizando o programa *Sigmaplot*, versão 12.0 (Systat Software, San

Jose, CA), os dados em  $[\Theta]$  de todos os peptídeos foram agrupados para comparação dos resultados.

### 3.6 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR FTIR

A luz na frequência do infravermelho pode ser absorvida por uma biomolécula, quando sua frequência iguala-se à frequência de vibração molecular (BARTH; ZSCHERP, 2002). As frequências vibracionais de uma proteína são derivadas principalmente da sua estrutura química, através da força das ligações e das massas dos átomos ligantes. Aplicando-se a transformada de Fourier ao interferograma obtido pelo espectrômetro de IR, gera-se um espectro de FTIR (Infravermelho com transformada de Fourier) do composto analisado.

A região do espectro de infravermelho de proteínas e peptídeos em torno de  $1650\text{ cm}^{-1}$  ( $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) é denominada AMIDA I e relaciona-se principalmente à energia vibracional pelo estiramento da ligação carbonila (C=O) do esqueleto proteico, com pequena contribuição do estiramento fora do plano da ligação C-N, da deformação C-C-N e da torção no plano da ligação N-H. A vibração da Amida I pode variar de acordo com os aminoácidos que compõem a cadeia lateral da proteína. Como a cadeia lateral também afeta a estrutura secundária das proteínas, a região da Amida I é comumente utilizada para investigação da estrutura secundária de proteínas (BARTH; ZSCHERP, 2002).

A região em torno de  $1550\text{ cm}^{-1}$  é classificada como AMIDA II e resulta principalmente da combinação fora de fase da vibração no plano da ligação NH e do estiramento da ligação CN. A vibração da Amida II também é influenciada pela cadeia lateral da proteína, porém a correlação é pequena entre a Amida II e a estrutura secundária da proteína.

A região de  $1400 - 1200\text{ cm}^{-1}$ , ou AMIDA III, é a combinação em fase da vibração no plano da ligação NH e do estiramento da ligação CN. Tanto a cadeia lateral como o *backbone* da proteína interferem na vibração da Amida III, fazendo com que essa região não tenha muita correlação com a estrutura secundária das proteínas.

Alíquotas de  $50\mu\text{L}$  de cada peptídeo a  $2\text{ mM}$  foram acondicionadas em recipientes eppendorfs de  $200\mu\text{L}$ , congeladas e liofilizadas. O pó obtido pela liofilização foi utilizado para os ensaios de infravermelho.

Os ensaios de infravermelho foram realizados em espectrômetro NICOLET 6700, utilizando o programa OMNIC 8.0.342, versão do driver 8.0, versão de fábrica 2.10, *Thermo Fisher Scientific Inc.*

Foram coletados espectros de IR dos peptídeos, seguindo-se do seu processamento através do programa *Omnice*, supra citado. Os espectros foram suavizados pela função *AUTOSMOOTH*, corrigida sua linha de base por meio da função *BASELINE CORRECT* e realizada a transformada de Fourier, utilizando os parâmetros citados na Tabela 7, a seguir.

**Tabela 7. Parâmetros utilizados para a deconvolução dos espectros de FTIR dos peptídeos**

Perfil de pico	Voight
largura à meia altura - FWHH	15
flutuação máxima ( <i>noise target</i> )	0.5
sensibilidade	alta
linha de base	nenhuma

O assinalamento da região da Amida I do espectro vibracional de proteínas proposto por Barth e Zscherp (*apud* GOORMAGHTIGH, 1994) e Goormaghtigh (GOORMAGHTIGH; RUYSSCHAERT; RAUSSENS, 2006) foi empregado para determinação da estrutura secundária das amostras dos peptídeos em  $^1\text{H}_2\text{O}$  (Tabela 8).

**Tabela 8. Assinalamento das bandas da amida I no infravermelho, proposto por Barth e Zscherp (*apud* GOORMAGHTIGH, 1994) e Goormaghtigh (GOORMAGHTIGH; RUYSSCHAERT; RAUSSENS, 2006)**

<b>ESTRUTURA SECUNDÁRIA</b>	<b>BANDA (<math>\text{cm}^{-1}</math>) média (min – max)</b>
<b>folha <math>\beta</math></b>	1633 (1623 - 1641) - principal 1684 (1672 – 1695)
<b><math>\alpha</math>-hélice</b>	1654 (1648 – 1657)
<b>estrutura desordenada</b>	1654 (1642 – 1657)
<b>voltas (<i>turns</i>)</b>	1672 (1662 – 1686)

Foram consideradas as áreas dos picos da região da Amida I para estabelecimento da proporção dos componentes de estrutura secundária de cada peptídeo.

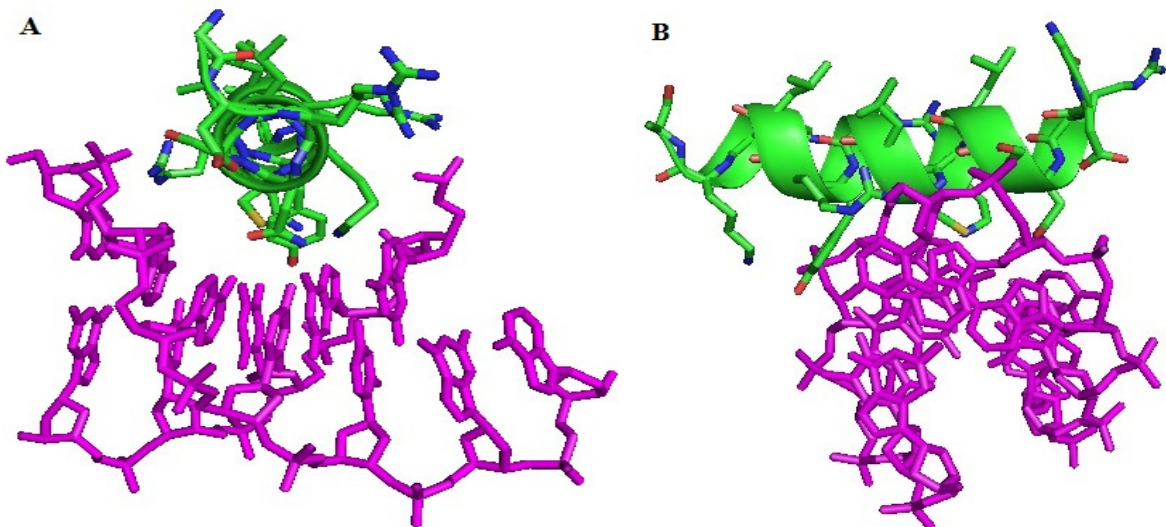
Os espectros obtidos foram processados e normalizados através do programa *Sigmaplot*, versão 12.0 (Systat Software, San Jose, CA), a fim de se permitir comparação entre os peptídeos, visto a massa utilizada de cada peptídeo não ser uniforme.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 PEPTÍDEOS ANÁLOGOS A $\alpha$ 1E2

A partir do modelo de estrutura do DNA de HPV18 cocristalizado com a proteína E2 viral (KIM, S.-S. *et al.*, 2000) (Figura 8) e do alinhamento da proteína E2 de diversos papilomavirus (Figura 6), foram propostas mutações da sequência primária da  $\alpha$ 1E2 em aminoácidos que não interagissem diretamente com o DNA. Esses aminoácidos em todas as proteínas E2 de papilomavirus são tipicamente valinas, isoleucinas e leucinas: aminoácidos apolares que não participam diretamente da ligação da hélice ao DNA, mas sim das interações hidrofóbicas entre as hélices e as folhas  $\beta$ , estabilizando a estrutura terciária da proteína. Na interação entre o peptídeo e o DNA, esses aminoácidos (Leucinas) ficam localizados na região não contactante com o DNA (Figura 9). Por isso, tais resíduos foram eleitos para mutações que permitissem a inserção de ligações intramoleculares, visando o aumento do grau de organização do peptídeo.



**Figura 8.** Modelo da sequência original da hélice 1 da proteína E2 de HPV18, da Gly294 a His309, representada pelo peptídeo  $\alpha$ 1E2a(*wt*). Em magenta o DNA de HPV; em verde o peptídeo  $\alpha$ 1E2a. A) Visão frontal do peptídeo. B) Visão lateral do peptídeo

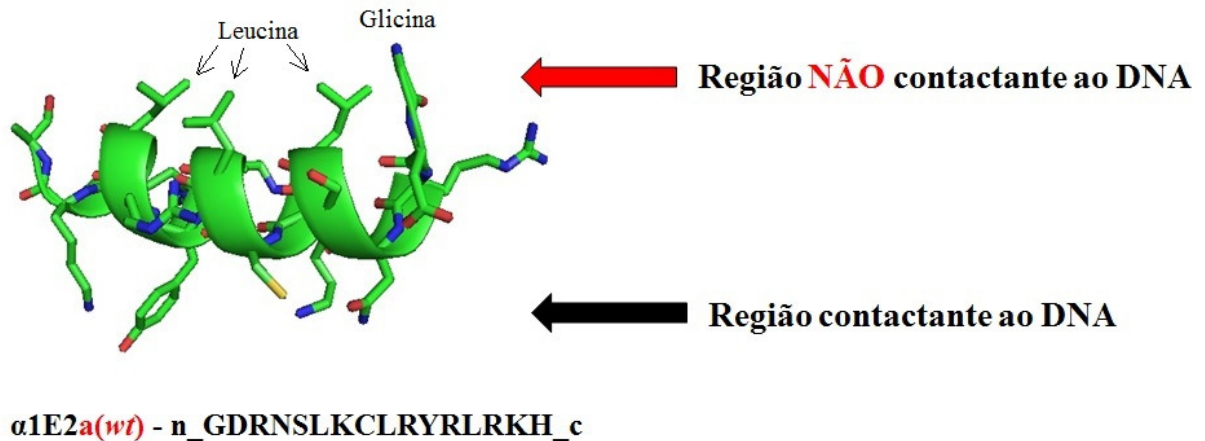


Figura 9. Esquema do peptídeo  $\alpha$ 1E2a, mostrando as regiões do peptídeo que interagem ou não com o DNA de HPV.

A estratégia empregada no planejamento dos peptídeos nesse estudo se baseou na busca por ligações intramoleculares que permitissem estabilizar maior conteúdo de estrutura secundária preferencialmente na forma de  $\alpha$ -hélice, o que minimizaria o gasto energético de enovelamento e assim permitiria o aumento da afinidade e especificidade dos peptídeos pela sequência consenso de DNA.

As estruturas planejadas levaram em consideração:

- **Ligações dissulfeto** entre resíduos de Cisteína;
- **Ligações metálicas** entre resíduos de Histidinas, coordenadas por íon  $Zn^{+2}$ ;
- **Ligações salinas** entre aminoácidos polares e/ou carregados.

Como o peptídeo original ( $\alpha$ 1E2a) possuía um resíduo de Cisteína (Cys) na posição 301, para não haver interferência desse resíduo (301) na ligação dissulfeto nos resíduos desejados (Cys<sub>294</sub>-Cys<sub>299</sub>; Cys<sub>299</sub>-Cys<sub>302</sub>), a Cys<sub>301</sub> foi mutada por Serina (Ser), gerando o peptídeo  $\alpha$ 1E2b, já que Cys e Ser possuem estrutura química semelhante, exceto pelo átomo de enxofre da Cys que corresponde ao átomo de oxigênio na Ser. Tal substituição foi utilizada para geração da sequência primária de todos os demais peptídeos. Da mesma forma, para se inserir uma ligação metálica entre duas Histidinas (His), através da mutação das Leucinas da sequência original, a Histidina C-terminal presente na sequência de  $\alpha$ 1E2a foi mutada por Alanina (Ala), nos peptídeos contendo ligações metálicas. A substituição de um aminoácido por Ala num peptídeo é comumente utilizada para se verificar a contribuição do aminoácido substituído para as características e atividades do peptídeo, pela Ala ser considerada um aminoácido funcionalmente inerte (MORRISON; WEISS, 2001).

Foram propostos, então, peptídeos mutantes de  $\alpha 1E2a$ , apresentando uma Ligação Dissulfeto ( $\alpha 1E2c$ ,  $\alpha 1E2d$ ,  $\alpha 1E2g$  e  $\alpha 1E2h$ ) e/ou Ligação Metálica ( $\alpha 1E2e$ ,  $\alpha 1E2f$ ,  $\alpha 1E2g$ ), e/ou Ligação Salina ( $\alpha 1E2h$  e  $\alpha 1E2i$ ), como estratégia para se aumentar a organização espacial do peptídeo em solução aquosa. O peptídeo  $\alpha 1E2j$  corresponde à  $\alpha 1E2a$  mutada na His C-terminal para Alanina (Ala).

Os peptídeos mutantes são mostrados na Tabela 9 e nas Figuras 10 a 14. A tabela 9 mostra em **negrito** os aminoácidos envolvidos na interação direta com o DNA e, em **vermelho** os aminoácidos mutados, em relação ao peptídeo original ( $\alpha 1E2a$ ).

Tabela 9. Sequência primária dos peptídeos mutantes de  $\alpha 1E2$  propostos

PEPTÍDEO	SEQUÊNCIA PRIMÁRIA	ALTERAÇÃO
$\alpha 1E2a$	n_GDRNSLKCLRYLRKH_c	sequencia primária original
$\alpha 1E2b$	n_GDRNSLK <b>S</b> LRYLRLKH_c	Cys <sub>301</sub> mutada por Ser <sub>301</sub>
$\alpha 1E2c$	n_ <b>C</b> DRNS <b>C</b> KS <b>L</b> RYLRKH_c	ligação dissulfeto entre Cys <sub>294</sub> -Cys <sub>299</sub>
$\alpha 1E2d$	n_GDRNSLK <b>S</b> CR <b>Y</b> R <b>C</b> RKH_c	ligação dissulfeto entre Cys <sub>302</sub> -Cys <sub>306</sub>
$\alpha 1E2e$	n_GDRNS <b>H</b> K <b>S</b> HRYLRKA_c	ligação metálica entre His <sub>299</sub> -His <sub>302</sub>
$\alpha 1E2f$	n_GDRNSLK <b>S</b> HRYR <b>H</b> RKA_c	ligação metálica entre His <sub>302</sub> -His <sub>306</sub>
$\alpha 1E2g$	n_ <b>C</b> DRNS <b>C</b> K <b>S</b> HRYR <b>H</b> RKA_c	ligações dissulfeto e metálica
$\alpha 1E2h$	n_ <b>C</b> DRNS <b>C</b> K <b>S</b> ERYR <b>Q</b> RKH_c	ligações dissulfeto e salina
$\alpha 1E2i$	n_GDRNS <b>N</b> K <b>S</b> ERYRLRKH_c	ligação salina entre Asn <sub>299</sub> -Asp <sub>302</sub>
$\alpha 1E2j$	n_GDRNSLKCLRYLRKA_c	substituição da His C-terminal por Ala

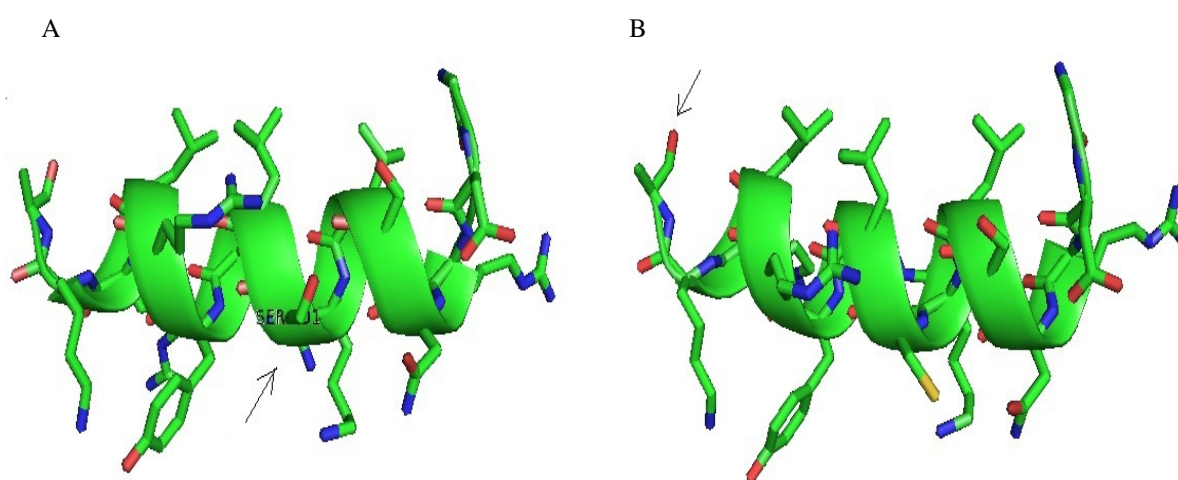
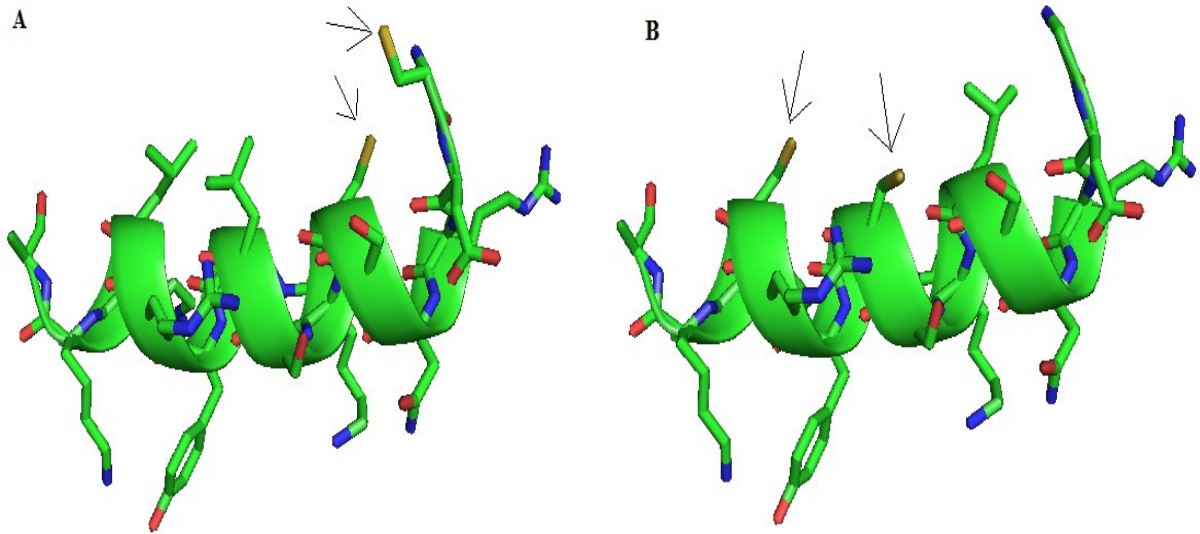
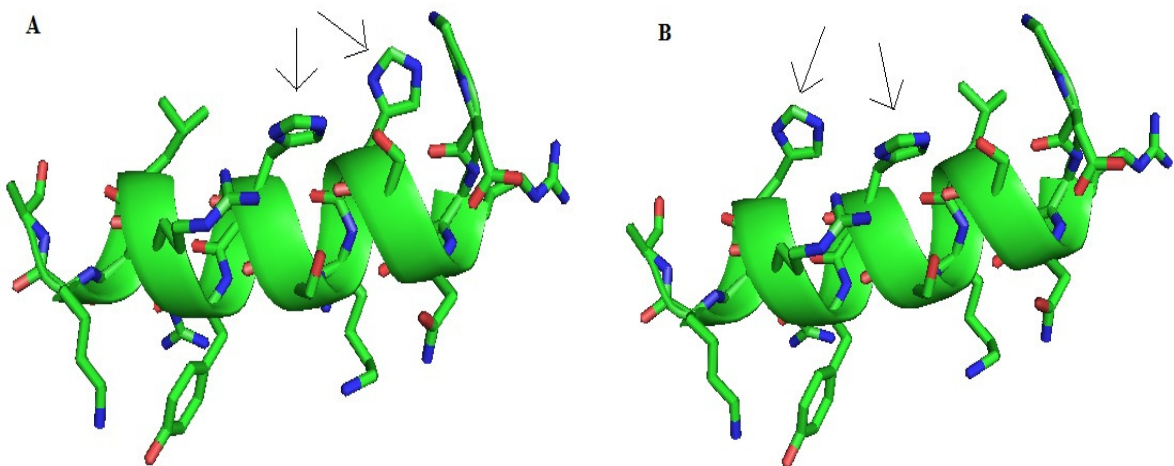


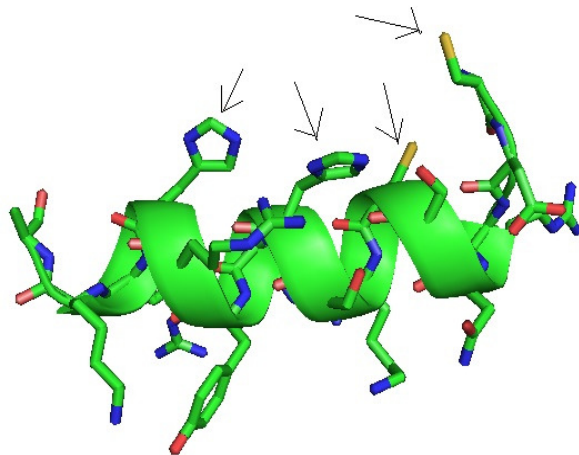
Figura 10. Mutações pontuais. A) Modelo do peptídeo  $\alpha 1E2b$ : mutação da Cys<sub>301</sub> por Ser<sub>301</sub>; B) Modelo do peptídeo  $\alpha 1E2j$ : mutação da His C-terminal (His<sub>309</sub>) por Ala<sub>309</sub>. As setas indicam os aminoácidos mutados.



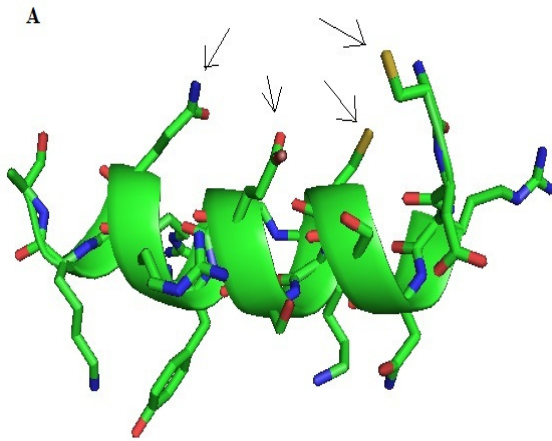
**Figura 11. Mutantes com ligações dissulfeto.** A)  $\alpha 1E2c$ : ligação dissulfeto entre Cys<sub>294</sub>-Cys<sub>299</sub>. B)  $\alpha 1E2d$ : ligação dissulfeto entre Cys<sub>302</sub>-Cys<sub>306</sub>. Os aminoácidos mutados são indicados pelas setas.



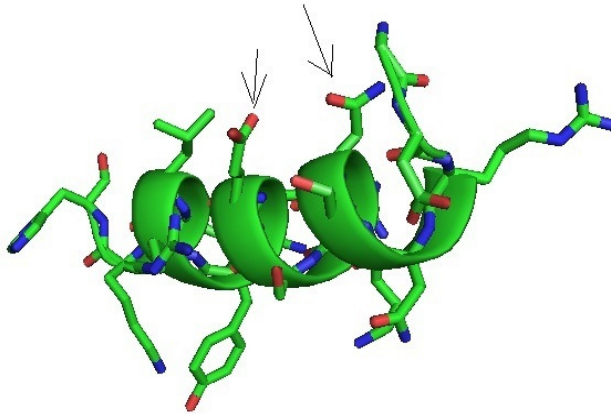
**Figura 12. Mutantes com ligações metálicas.** A sequência 1<sup>a</sup> de  $\alpha 1E2a$  foi mutada para inserção de dois resíduos de Histidinas (His), formando uma ligação metálica entre His coordenada com Zn<sup>+2</sup>. A)  $\alpha 1E2e$ : ligação metálica entre His<sub>299</sub>-Gln<sub>302</sub>. B)  $\alpha 1E2f$ : ligação metálica entre His<sub>302</sub>-His<sub>306</sub>.



**Figura 13. Mutante com ligações dissulfeto e metálica.** Peptídeo  $\alpha 1E2g$ : ligação dissulfeto entre Cys<sub>294</sub>-Cys<sub>299</sub> e ligação metálica coordenada com Zn<sup>+2</sup> entre His<sub>302</sub>-His<sub>306</sub>.



**Figura 14. Mutante com ligações dissulfeto e salina.** Peptídeo  $\alpha 1E2h$ : ligação dissulfeto entre Cys<sub>294</sub>-Cys<sub>299</sub> e ligação salina entre Asp<sub>299</sub>-Gln<sub>302</sub>.



**Figura 15. Mutante com ligação salina.** Peptídeo  $\alpha 1E2i$ : ligação salina entre Asn<sub>299</sub>-Asp<sub>302</sub>.

## 4.2 PARAMETRIZAÇÃO DO DNA ESPECÍFICO E NÃO ESPECÍFICOS

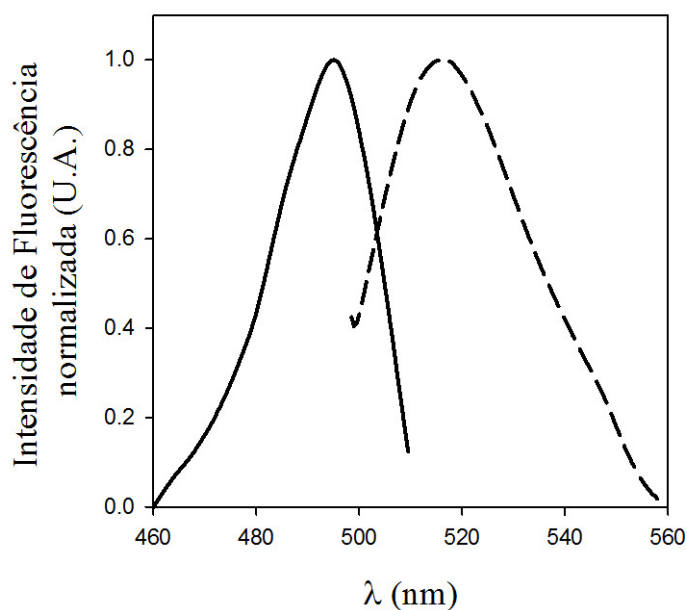
O DNA considerado **específico** nesse trabalho trata-se de um oligonucleotídeo de HPV de 18 pb ligado à Fluoresceína (5'6-FAM) como cromóforo.

Como DNAs não específicos foram empregados um oligonucleotídeo poli(CG) de 21 pb ligado a um derivado da Rodamina (TAMRA) como cromóforo (**DNA não específico A**), e um oligonucleotídeo semelhante ao DNA específico, porém com os nucleotídeos da sequência palíndromo alterados (**DNA não específico B**). O DNA não específico A é composto em 67% de Citosinas (C) e Guaninas (G) e não possui a sequência palíndromo de reconhecimento e ligação da  $\alpha 1E2$  ao DNA de HPV.

As condições de  $\lambda_{\text{excitação}}$  e  $\lambda_{\text{emissão}}$  utilizadas para os ensaios de afinidade entre cada peptídeo e os DNAs específico e não específicos foram otimizadas, de acordo com o cromóforo de cada DNA. Foram feitas varreduras de excitação e de emissão de fluorescência de amostras de cada DNA, levando-se em conta os  $\lambda_{\text{excitação}}$  e  $\lambda_{\text{emissão}}$  da literatura. Os resultados são mostrados a seguir.

#### 4.2.1 DNA ESPECÍFICO

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA específico mostrados a seguir representaram a média de 5 acumulações de espectros. Os resultados foram normalizados e indicaram  $\lambda$  máximo de excitação a  $\sim 490$  nm e emissão a  $\sim 520$  nm, com pouca interferência do sinal de excitação sobre o sinal de emissão, e vice versa (Figura 14).



**Figura 16. Espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA específico.** Espectro de excitação (linha contínua); espectro de emissão (tracejado), obtidos no espectrofluorímetro JASCO FP-6300.

As leituras de anisotropia no espectrofluorímetro SPETRAMAX M5 em diferentes  $\lambda_{\text{excitação}}$ , considerando-se  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 520 nm estão descritas na Tabela 10.

**Tabela 10. Anisotropia do DNA específico em diferentes condições de leitura**

$\lambda$ excitação	$\lambda$ emissão	Anisotropia (U.A.)
450 nm	520 nm	$0.162 \pm 0.003$
460 nm	520 nm	$0.212 \pm 0.004$
470 nm	520 nm	$0.229 \pm 0.006$
480 nm	520 nm	$0.165 \pm 0.001$
490 nm	520 nm	0.161

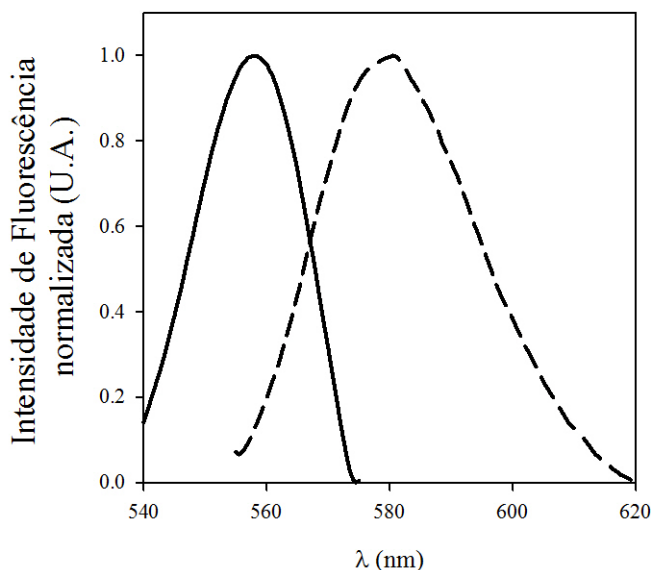
Os espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA específico obtidos através do espectrofluorímetro JASCO FP-6300 indicaram  $\lambda$  máximo de excitação a 490 nm e de emissão a 520 nm, sem haver superposição ou interferência da excitação na emissão, e vice-versa (Figura 14). Em acordo com a literatura, que indica como  $\lambda$  de máxima excitação e emissão para fluoresceína ligada a ácidos nucleicos os valores de 494 nm e 518 nm, respectivamente (INVITROGEN, 2005). Além disso, a anisotropia do mesmo DNA indicada pelo espectrofluorímetro SPECTRAMAX M5 estava dentro da faixa possível pela Equação 1 ( $r > 0,4$ ).

Assim, foram considerados os  $\lambda$  para os ensaios espectrofluorimétricos com DNA específico nesse trabalho:

- $\lambda$  excitação = 490 nm
- $\lambda$  emissão = 520 nm

#### 4.2.2 DNA NÃO ESPECÍFICO A: (5' TAMRA)-poli(CG)

Os espectros de excitação e emissão referentes ao DNA não específico A obtidos no equipamento JASCO representaram a média de 5 acumulações de espectros. Eles foram normalizados, gerando a Figura 17.



**Figura 17. Espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA não específico A.** Espectro de excitação (linha contínua); espectro de emissão (tracejado).

Os valores máximos de excitação e emissão de fluorescência ocorreram nos  $\lambda$  abaixo:

- $\lambda_{\text{max\_excitação}} = 557 \text{ nm}$
- $\lambda_{\text{max\_emissão}} = 580 \text{ nm}$

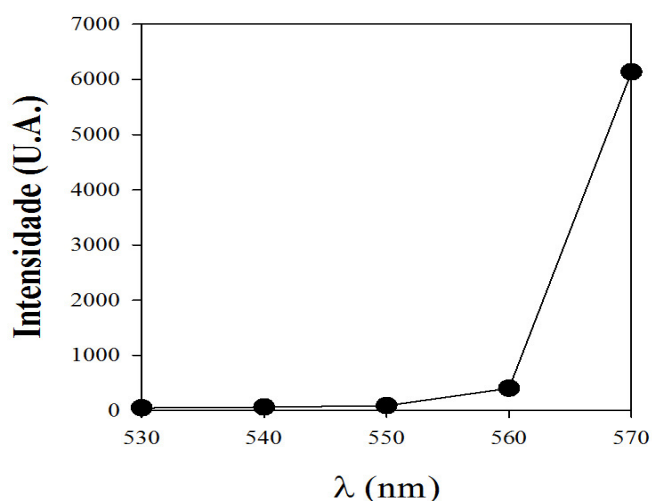
Leituras de anisotropia da mesma alíquota de DNA também foram realizadas no espectrofluorímetro SPECTRAMAX M5, em diferentes  $\lambda_{\text{excitação}}$  e  $\lambda_{\text{emissão}}$ , encontrando-se os valores seguintes:

**Tabela 11. Anisotropia do DNA não específico A em diferentes condições de leitura**

$\lambda_{\text{excitação}}$	$\lambda_{\text{emissão}}$	Anisotropia (U.A.)
557 nm	580 nm	0.410
544 nm	590 nm	0.110
555 nm	580 nm	0.290
550 nm	590 nm	0.158
555 nm	590 nm	0.182



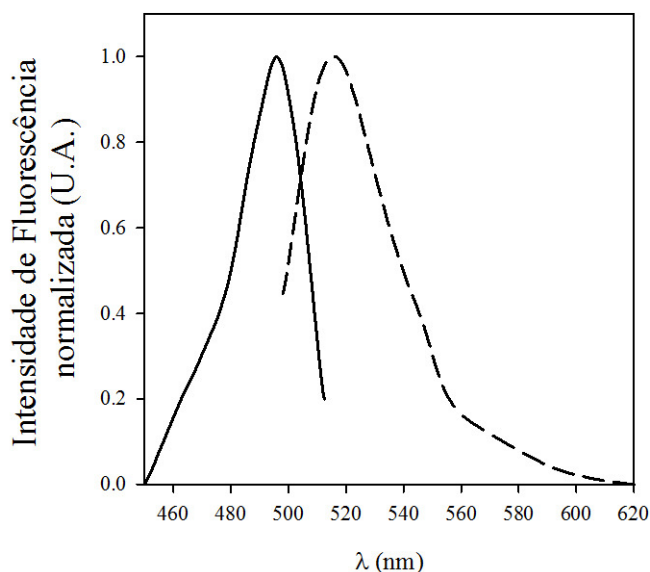
Realizou-se avaliação quanto à estabilidade do sinal de linha de base durante a varredura da excitação do DNA não específico A, para minimizar-se a interferência do espelhamento de luz durante as leituras. Como mostrado na Figura 18, a linha de base mantém-se estável até ~550 nm.



**Figura 18.** Avaliação da estabilidade do sinal de linha de base do espectro de excitação de fluorescência do DNA não específico A, a partir do SPECTRAMAX M5. A linha de base do espectro mantém-se estável até ~550nm. Sendo esse  $\lambda$  utilizado como  $\lambda_{\text{excitação}}$  do DNA em questão.

#### 4.2.3 DNA NÃO ESPECÍFICO B: (5'6-FAM)-DNA não específico

O DNA não específico B foi investigado nas mesmas condições do DNA específico, devido aos dois DNAs estarem ligados à fluoresceína (5'6-FAM) como cromóforo. Os espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA não específico B são mostrados a seguir, representando a média de 5 acumulações de espectros. Os resultados foram normalizados e indicaram  $\lambda$  máximo de excitação a 496 nm e emissão a 516 nm. Foram considerados os  $\lambda$  de 490 nm para excitação e 520 nm para emissão nos experimentos com esse DNA, para se manter a padronização realizada com o DNA específico e visto que esses  $\lambda$  estão próximos aos seus  $\lambda$  de máxima fluorescência de excitação ou emissão (Figura 19).



**Figura 19. Espectros de excitação e emissão de fluorescência do DNA não específico B.** Linha contínua: espectro de excitação; Tracejado: espectro de emissão.

O DNA não específico B apresentou espectros de excitação e emissão de fluorescência semelhantes ao DNA específico, o que era esperado pelos DNAs em questão estarem ligados ao mesmo cromóforo – fluoresceína (5´6-FAM).

### 4.3 ENSAIO DE ISOTERMA DE LIGAÇÃO PEPTÍDEO-DNA

Os dados gerados pelas titulações espectrofluorimétricas dos peptídeos foram processados pelo programa *Spectra Manager* e os gráficos respectivos gerados através do programa *Sigmaplot*, versão 12.0 (Systat Software, San Jose, CA).

#### 4.3.1 LIGAÇÃO $\alpha$ 1E2 x DNA ESPECÍFICO

A afinidade dos peptídeos pelo DNA de HPV18 foi investigada em diferentes condições de força iônica do meio reacional, utilizando-se concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl), para minimizar as interações não específicas entre peptídeo – DNA.

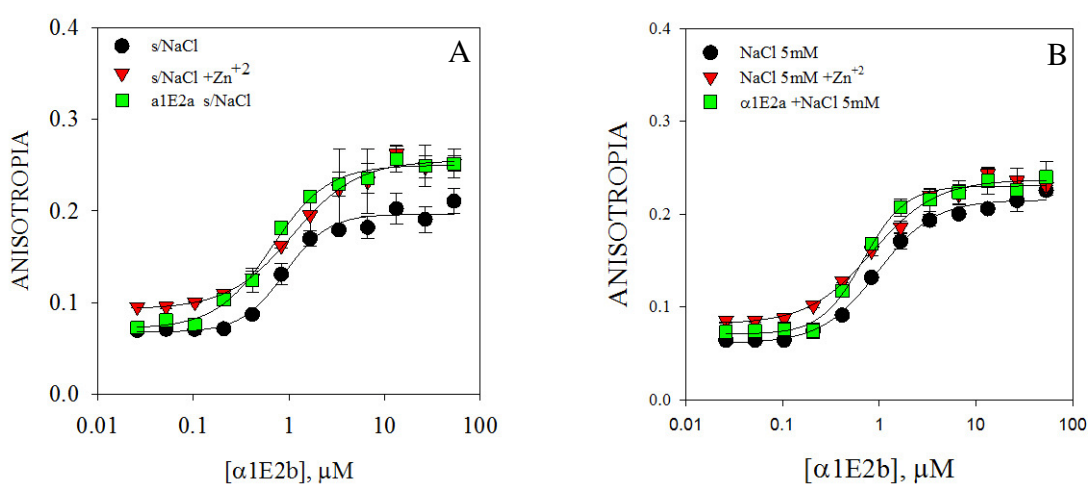
Os peptídeos com ligação metálica coordenada por íon zinco foram testados na presença ou ausência desse íon. A contribuição das ligações dissulfeto foi investigada através

de ensaios de afinidade em meios contendo ou não DTT como agente redutor. Os resultados obtidos foram agrupados de acordo com a natureza das mutações dos peptídeos. As curvas de afinidade do peptídeo  $\alpha 1E2a$  (*wt*) foram acrescentadas aos resultados de cada peptídeo como referencial para comparações.

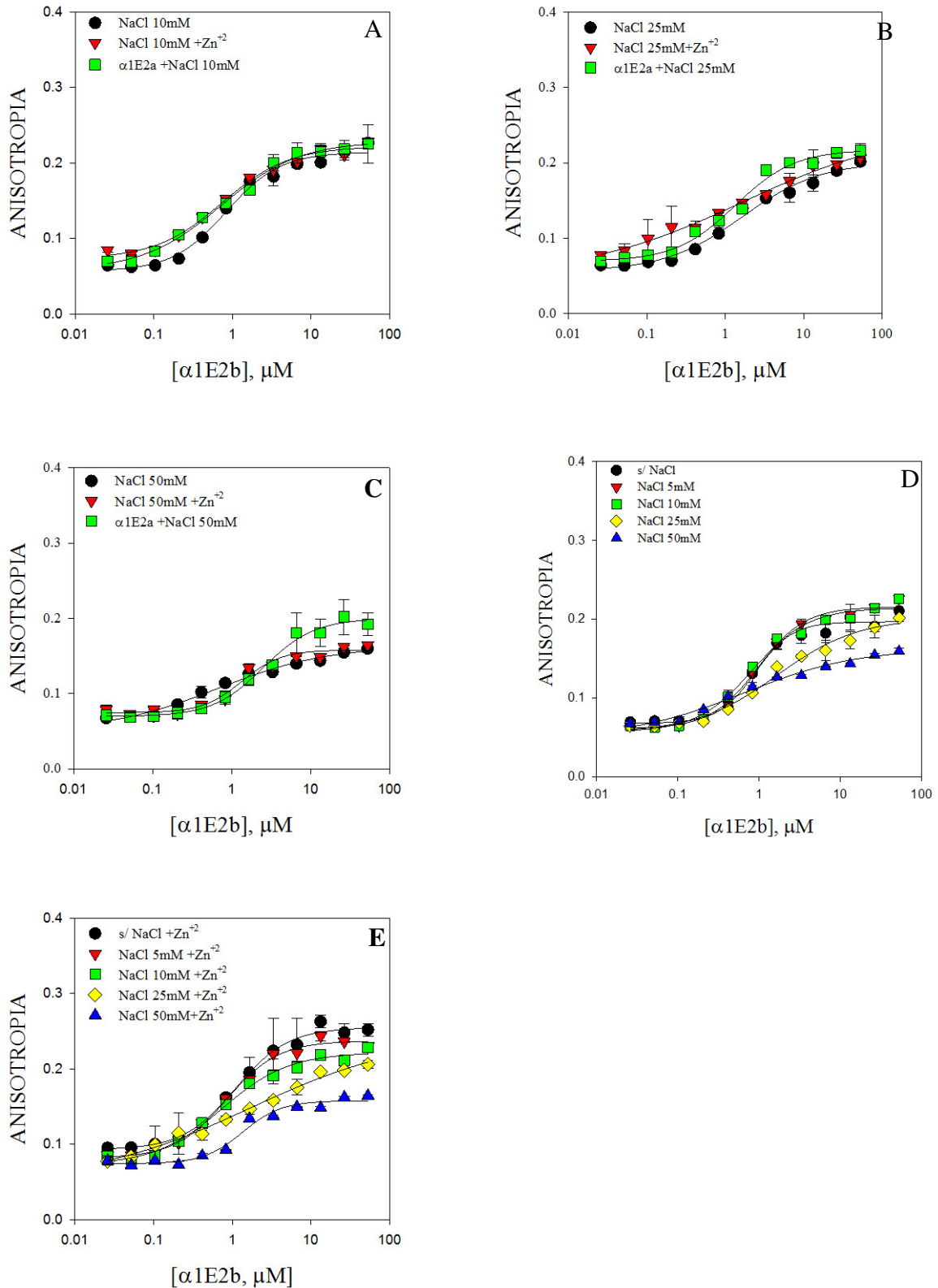
Os valores de *Kd* obtidos para o peptídeo  $\alpha 1E2a$  (*wt*) em função da concentração de NaCl do meio reacional foram semelhantes aos descritos na literatura para o peptídeo  $\alpha 1E2$  de HPV16 (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006). Esses valores serviram como padrões para comparação com os demais peptídeos.

#### 4.3.1.1 Mutação da Cisteína<sub>301</sub> por Serina<sub>301</sub>: $\alpha 1E2b$

O peptídeo  $\alpha 1E2b$  possui a Cys<sub>301</sub> mutada para Ser<sub>301</sub> em relação à sequência primária de  $\alpha 1E2a$ , como estratégia para se inserir uma ligação dissulfeto intramolecular no peptídeo sem a interferência desse resíduo de cisteína. Foi investigada se essa mutação pontual interferiria na afinidade do peptídeo pelo DNA específico. Os resultados são mostrados a seguir (Figuras 20 e 21), com as curvas utilizando o peptídeo  $\alpha 1E2a$  como referencial.



**Figura 20. Comparação entre afinidade de  $\alpha 1E2b$  frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional. (A) Na ausência de NaCl, com a adição ou não de Zn<sup>+2</sup> ao meio reacional. (B) Na presença de 5mM de NaCl, com a adição ou não de Zn<sup>+2</sup> ao meio reacional. Nos quadros de (A) a (B) foram adicionadas as curvas de afinidade de peptídeo  $\alpha 1E2a$  (*wt*) para comparação.**



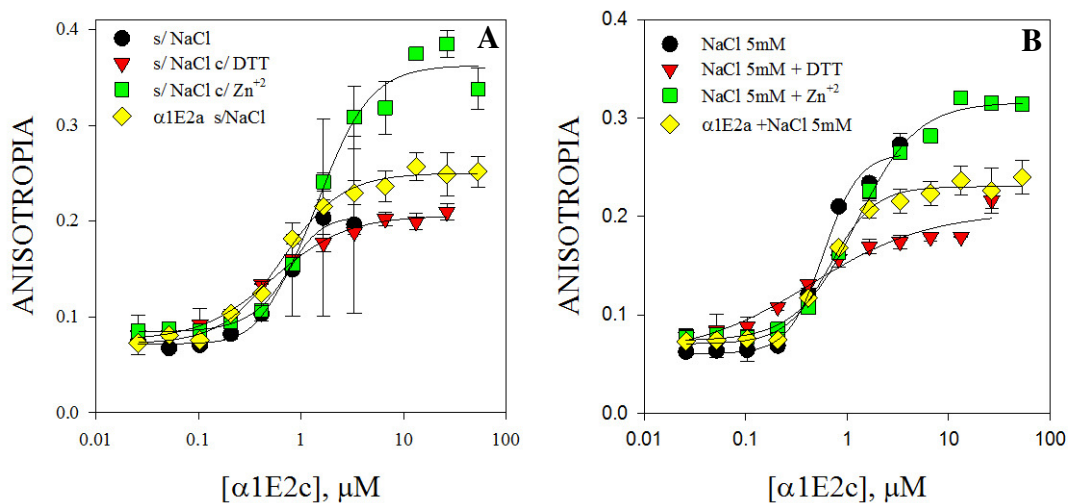
**Figura 21. Comparação entre afinidade de  $\alpha 1E2b$  frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.** (A) Na presença de 10mM de NaCl. (B) Na presença de 25mM de NaCl. (C) Na presença de 50mM de NaCl. (D) Afinidade em função da força iônica do meio. (E) Em função da força iônica do meio, na presença de  $Zn^{+2}$  a  $50\mu M$ . Nos quadros de (A) a (C) foram adicionadas as curvas de afinidade de  $\alpha 1E2a$  para comparação.

A mutação apenas da Cys<sub>301</sub> por Ser<sub>301</sub>, representada pelo peptídeo  $\alpha 1E2b$ , não alterou significativamente a afinidade do peptídeo original ( $\alpha 1E2a$ ) pelo DNA específico, como mostrado nas Figuras 20 e 21. A adição de ZnCl<sub>2</sub> ao meio reacional também não alterou o perfil de afinidade de  $\alpha 1E2b$  pelo DNA consenso, o que era esperado, já que tal peptídeo não apresentava ligação metálica coordenada por Zn<sup>+2</sup> em sua estrutura primária.

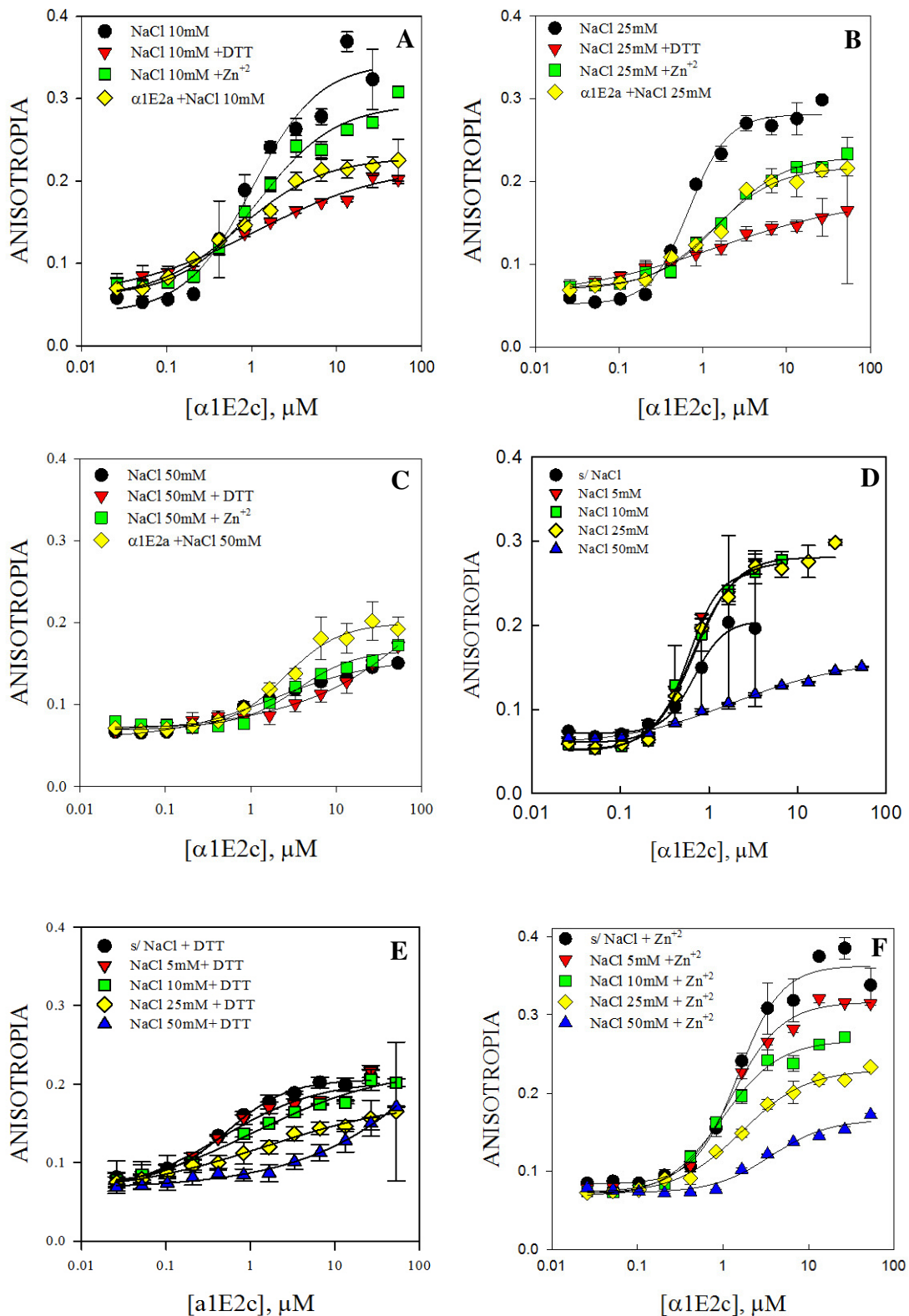
#### 4.3.1.2 Ligações dissulfeto: $\alpha 1E2c$ e $\alpha 1E2d$

A interferência da ligação dissulfeto entre a Cys<sub>294</sub>-Cys<sub>299</sub> ou Cys<sub>302</sub>-Cys<sub>306</sub> sobre a afinidade do peptídeo pelo DNA específico foi investigada, encontrando-se os resultados mostrados nas Figuras 22 a 25, a seguir.

##### a) $\alpha 1E2c$ : ligação dissulfeto entre Cys<sub>294</sub>-Cys<sub>299</sub>



**Figura 22.** Afinidade de  $\alpha 1E2c$  frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional. De (A) a (C) foram adicionadas as curvas de afinidade de  $\alpha 1Ea(wt)$  para comparação. (D) Afinidade em função da força iônica. (E) Afinidade em tampão contendo DTT 1 mM. (F) Afinidade em tampão contendo ZnCl<sub>2</sub> 50  $\mu M$ .



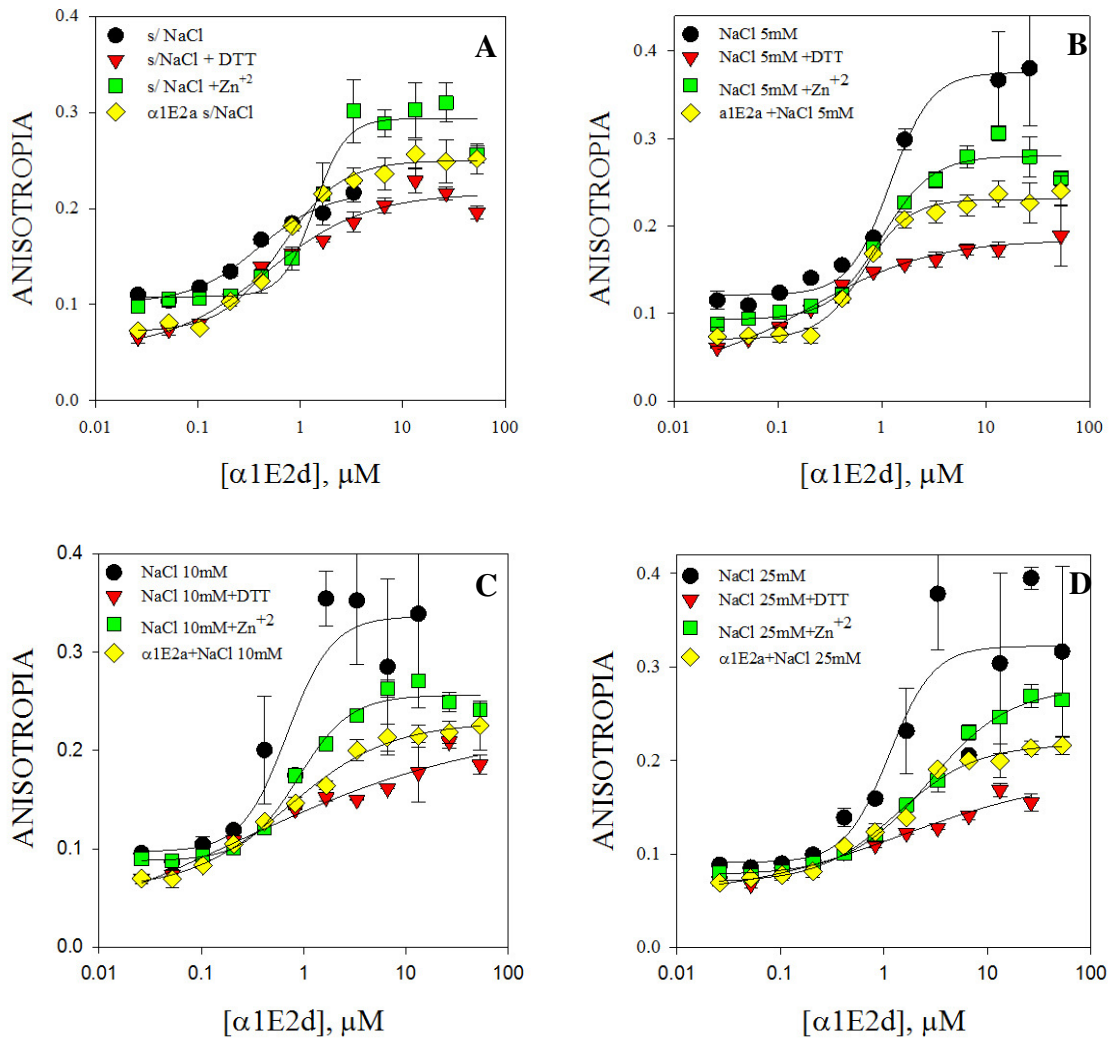
**Figura 23. Comparação entre afinidade de  $\alpha$ 1E2c frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.** De (A) a (C) foram adicionadas as curvas de afinidade de  $\alpha$ 1Ea(*w*) para comparação (A) Na presença de 10mM de NaCl. (B) Na presença de 25mM de NaCl. (C) Na presença de 50mM de NaCl. (D) Afinidade em função da força iônica. (E) Afinidade em tampão contendo DTT 1 mM. (F) Afinidade em tampão contendo ZnCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M.

O peptídeo  $\alpha 1E2c$  mostrou curvas de afinidade levemente deslocadas para a esquerda, com o aumento da força iônica do meio até 25mM de NaCl, em relação às curvas do peptídeo  $\alpha 1E2a$ . A 50mM de NaCl, a afinidade se torna menor que a de  $\alpha 1E2a$ . Em todos os casos, a adição do agente redutor ditioneitol (DTT) ao meio reacional a 1mM gerou deslocamento para a direita das curvas de afinidade. Indicando que a ruptura da ligação dissulfeto por esse agente redutor gerou diminuição da sua afinidade pelo DNA pesquisado (Figuras 22 e 23).

Em concentrações superiores a 6  $\mu$ M,  $\alpha 1E2c$  apresentou valores de anisotropia acima de 0,4 unidades arbitrárias (U.A.), que seria o valor máximo possível de anisotropia, segundo Lakowicz (2006). Tais pontos foram desconsiderados para os ajustes das curvas, mostradas nas Figuras 22 e 23. Esses valores acima de 0,4 U.A. sugerem a ocorrência de algum artefato de técnica ou a formação de agregados nessas concentrações, os quais gerariam espalhamento do feixe de luz incidente e aumento do valor de anisotropia lido para valores acima de 0,4 U.A. Tal fato pode ser relevante, pois indicaria que nessas condições o peptídeo formaria um agregado com o DNA, o que poderia inviabilizar esse último para a replicação ou transcrição viral, afetando seu ciclo de vida.

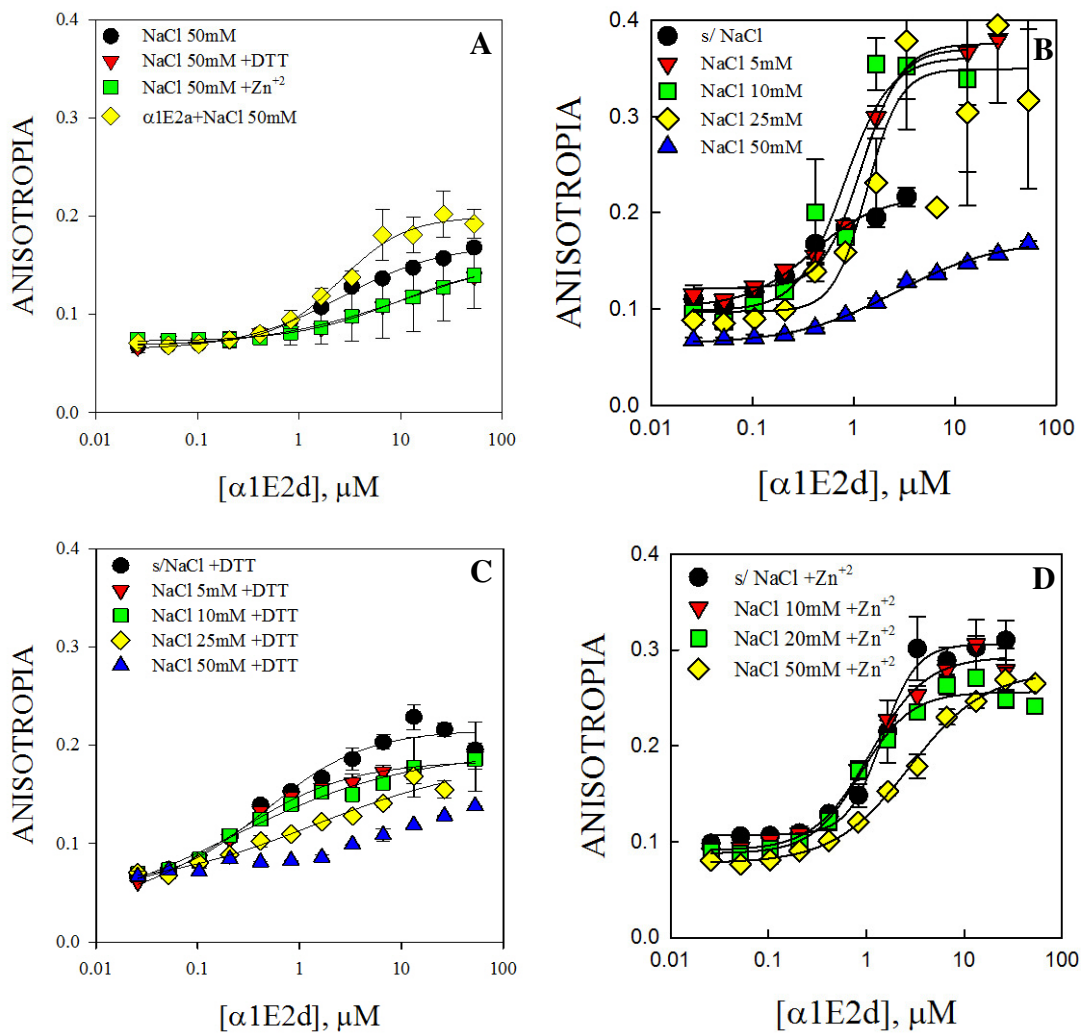
A adição de  $Zn^{+2}$  ao meio ocasionou diminuição da afinidade do peptídeo pelo DNA específico, em relação ao meio sem esse íon. Fato que era esperado, pelo peptídeo em questão não possuir ligação metálica coordenada por íon  $Zn^{+2}$  na sua estrutura primária.

b) *α1E2d*: ligação dissulfeto entre Cys<sub>302</sub>-Cys<sub>306</sub>



**Figura 24.** Afinidade de  $\alpha 1E2d$  frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional. (A) Em meio reacional sem NaCl. (B) Na presença de 5mM de NaCl. (C) Na presença de 10mM de NaCl. (D) Na presença de 25mM de NaCl. De (A) a (D) os experimentos foram feitos na presença ou ausência de ditioneitol (DTT) a 1mM ou Zn<sup>+2</sup> a 50 $\mu$ M.





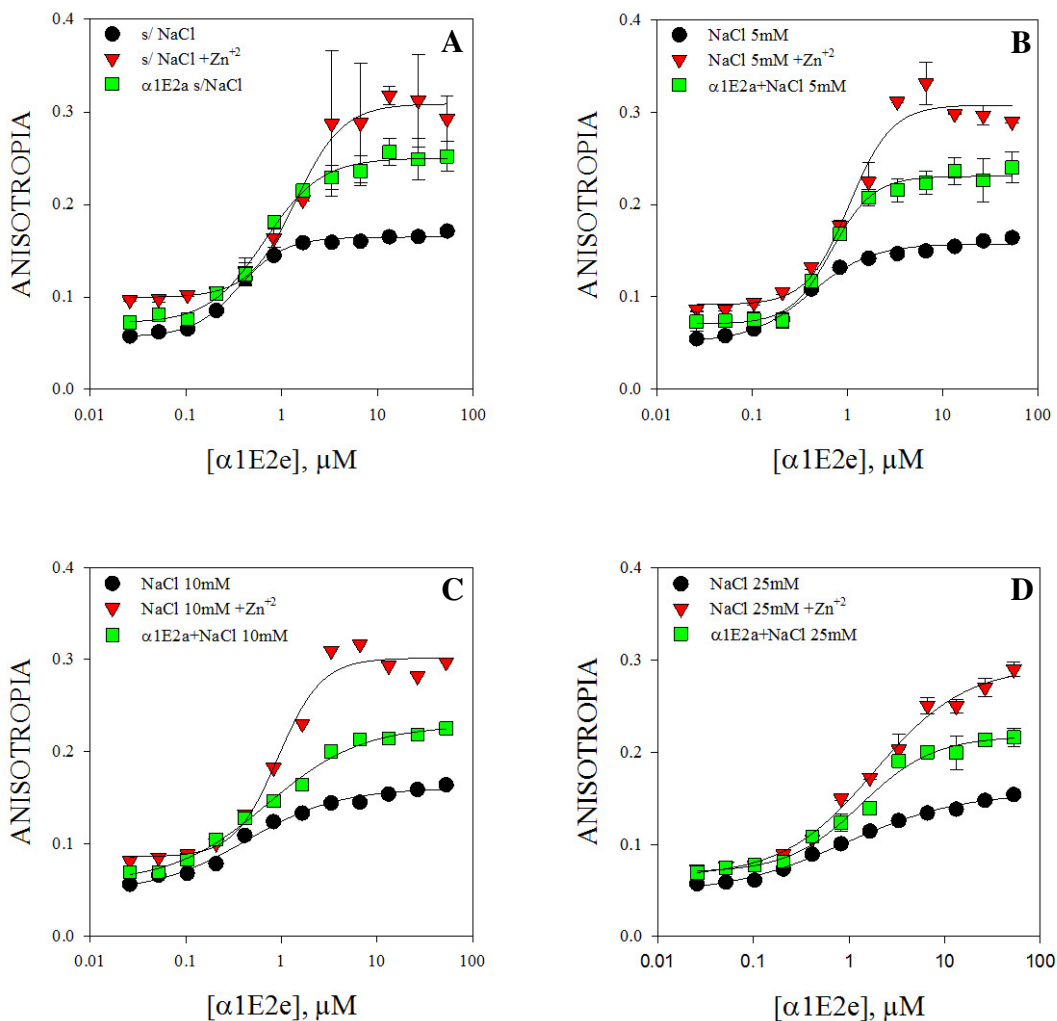
**Figura 25.** Afinidade de  $\alpha 1E2d$  frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional. (A) Afinidade em tampão com NaCl a 50mM. (B) Variando-se a força iônica do meio. (C) Em meio com DTT a 1mM. (D) Em meio contendo ZnCl<sub>2</sub> a 50 $\mu M$ .

O peptídeo  $\alpha 1E2d$  mostrou resultados semelhantes aos encontrados com o peptídeo  $\alpha 1E2c$ , com afinidade por DNA específico superior a  $\alpha 1E2a$  em meio reacional contendo até 25mM de NaCl, diminuição da afinidade com a adição de DTT ou Zn<sup>2+</sup> ao meio reacional e valores de anisotropia acima de 0,4 U.A (Figuras 24 e 25). em concentrações superiores a 6  $\mu M$  de peptídeo. Devido às semelhanças estruturais entre os peptídeos  $\alpha 1E2c$  e  $\alpha 1E2d$ , variando apenas a localização da ligação dissulfeto na sua estrutura primária, tais resultados mostram-se coerentes.

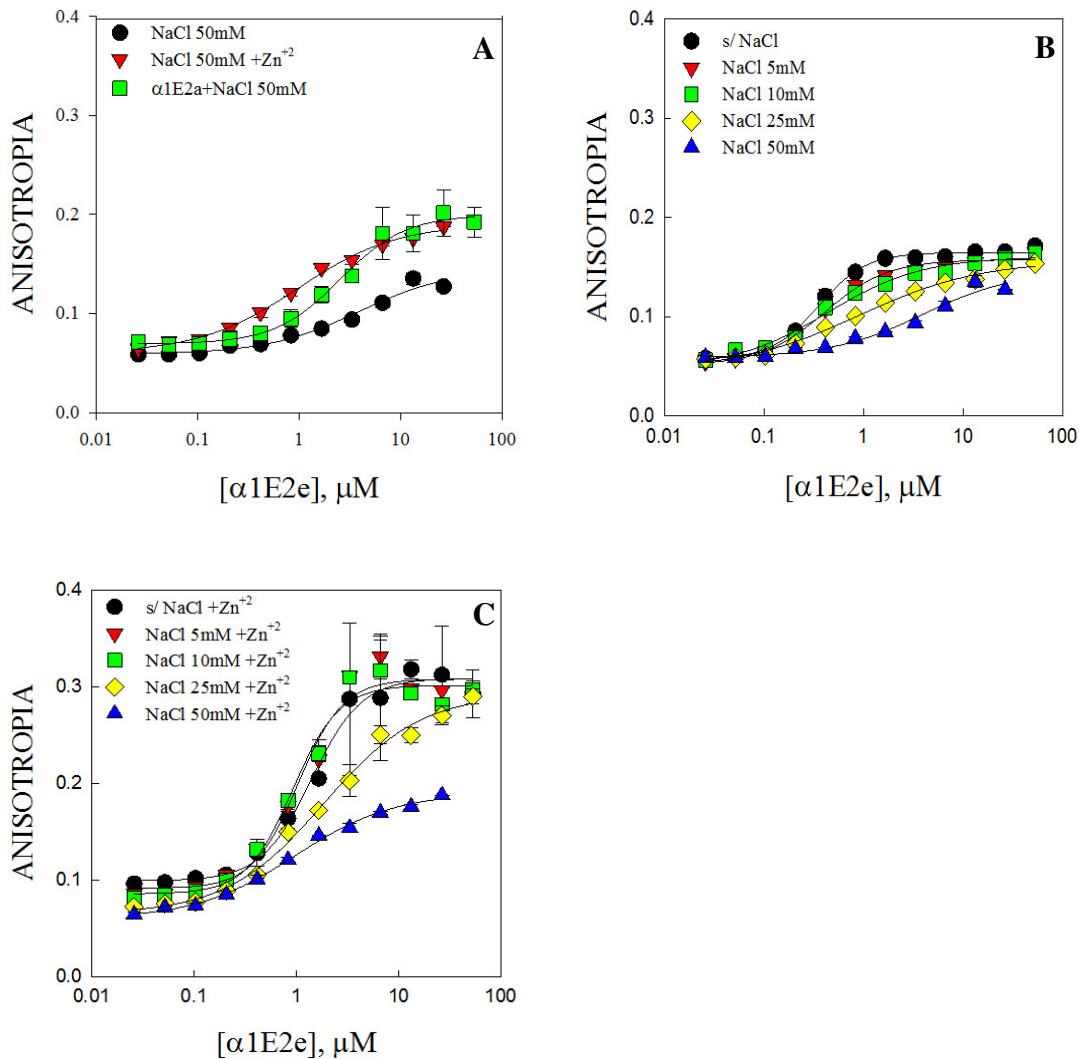
### 4.3.1.3 Ligação Metálica: $\alpha 1E2e$ e $\alpha 1E2f$

Os peptídeos  $\alpha 1E2e$  e  $\alpha 1E2f$  representam a sequência original de  $\alpha 1E2$  mutada para receber uma ligação metálica entre Histidinas, coordenadas pelo íon  $Zn^{+2}$ . A afinidade desses peptídeos frente a DNA de HPV foi estudada, observando-se os resultados mostrados a seguir:

a)  $\alpha 1E2e$ : ligação metálica entre His<sub>299</sub>-His<sub>302</sub> coordenadas por  $Zn^{+2}$



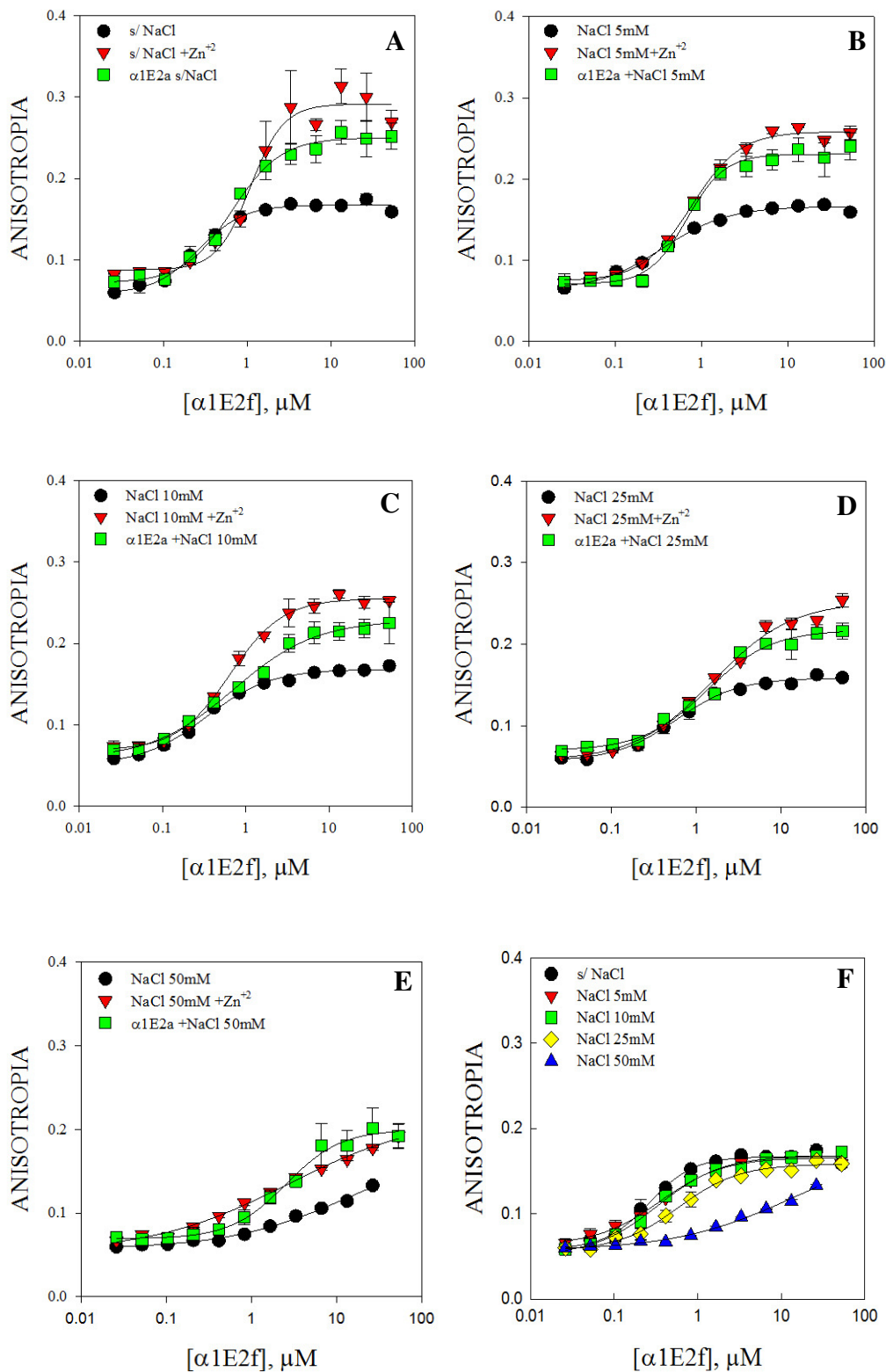
**Figura 26. Comparação entre afinidade de  $\alpha 1E2e$  frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional.** (A) Em meio reacional sem NaCl. (B) Na presença de 5mM de NaCl. (C) Na presença de 10mM de NaCl. (D) Na presença de 25mM de NaCl. De (A) a (E) os experimentos foram feitos na presença ou ausência de  $Zn^{+2}$  a 50 $\mu M$ . Nos quadros de (A) a (E) foram adicionadas as curvas de afinidade de peptídeo  $\alpha 1Ea(wt)$  para comparação.



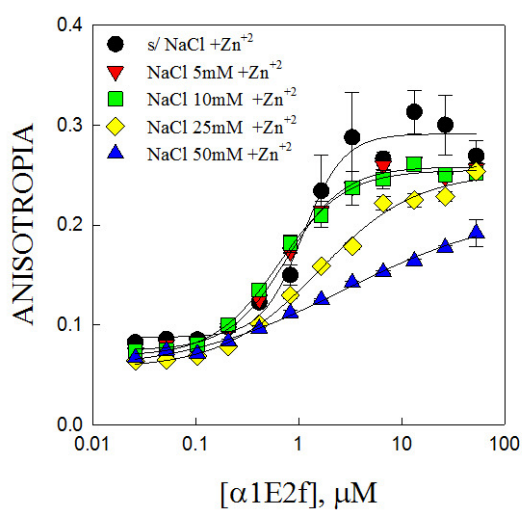
**Figura 27. Afinidade de  $\alpha 1E2e$  por DNA específico em função da força iônica e de zinco.** (A) Afinidade em tampão com NaCl a 50mM. São mostradas as afinidades do peptídeo em meios com força iônica crescente, na ausência (B) ou presença (C) de 50 $\mu M$  de ZnCl<sub>2</sub>.

Em todas as condições testadas, o peptídeo  $\alpha 1E2e$  mostrou afinidade inferior ao peptídeo  $\alpha 1E2a$  por DNA específico. Ao ser adicionado íon Zn<sup>+2</sup> ao meio reacional, a afinidade de  $\alpha 1E2e$  torna-se semelhante ou superior a de  $\alpha 1E2a$ . O que sugere a importância da coordenação das Histidinas por Zn<sup>+2</sup> na afinidade de  $\alpha 1E2e$  pelo DNA utilizado (Figuras 26 e 27).

b)  *$\alpha$ 1E2f*: ligação metálica entre His<sub>302</sub>-His<sub>306</sub> coordenadas por Zn<sup>+2</sup>



**Figura 28.** Comparação entre afinidade de  $\alpha$ 1E2f frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional. (A) Em meio reacional sem NaCl. (B) Na presença de 5mM de NaCl. (C) Na presença de 10mM de NaCl. (D) Na presença de 25mM de NaCl. (E) Na presença de 50mM de NaCl. (F) Afinidade em função da força iônica do meio. De (A) a (D) os experimentos foram feitos na presença ou ausência de Zn<sup>+2</sup> a 50 $\mu$ M. Nos quadros de (A) a (E) foram adicionadas as curvas de afinidade de peptídeo  $\alpha$ 1Ea(*wt*) para comparação.

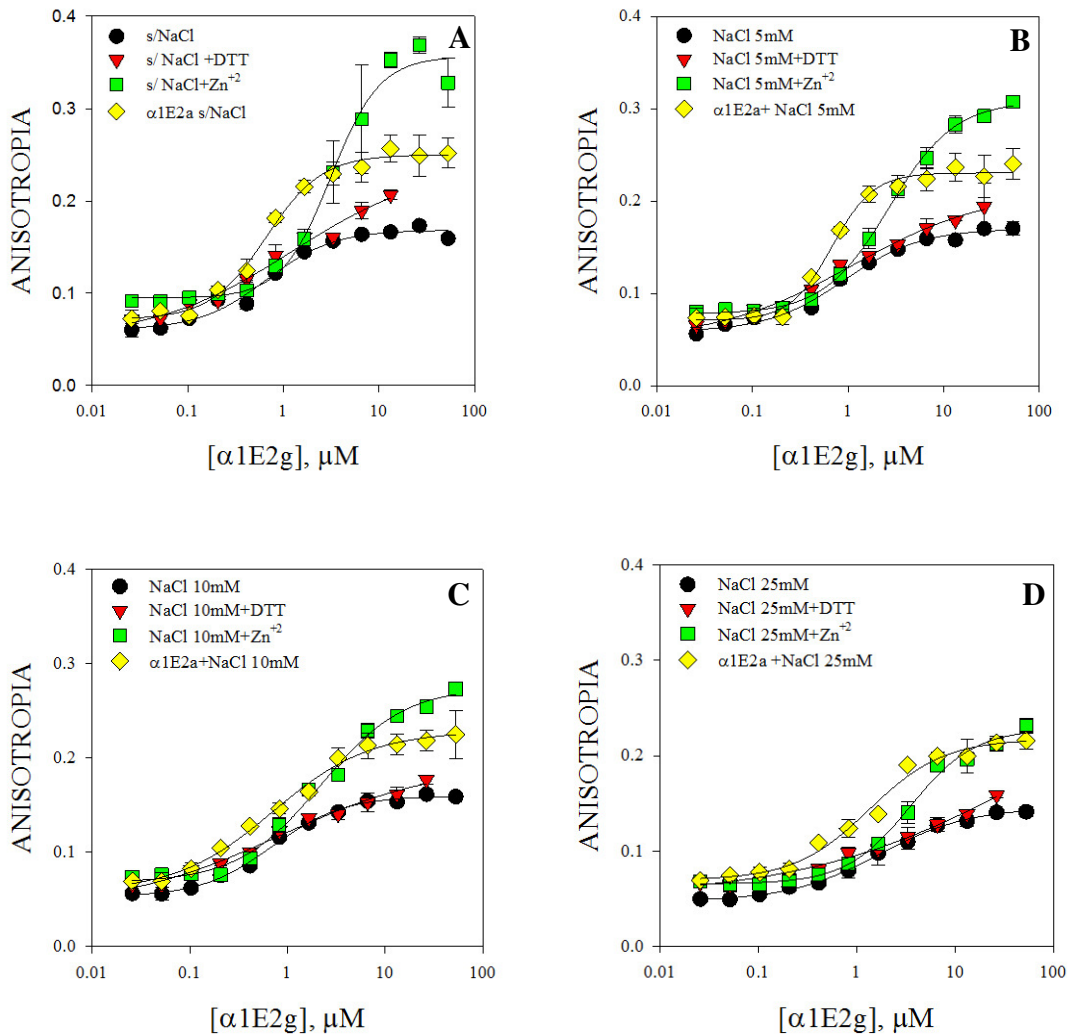


**Figura 29.** Afinidade de  $\alpha 1E2f$  por DNA específico em função da presença de zinco. Afinidade em função da força iônica do meio, presença de  $50\mu M$  de  $ZnCl_2$ .

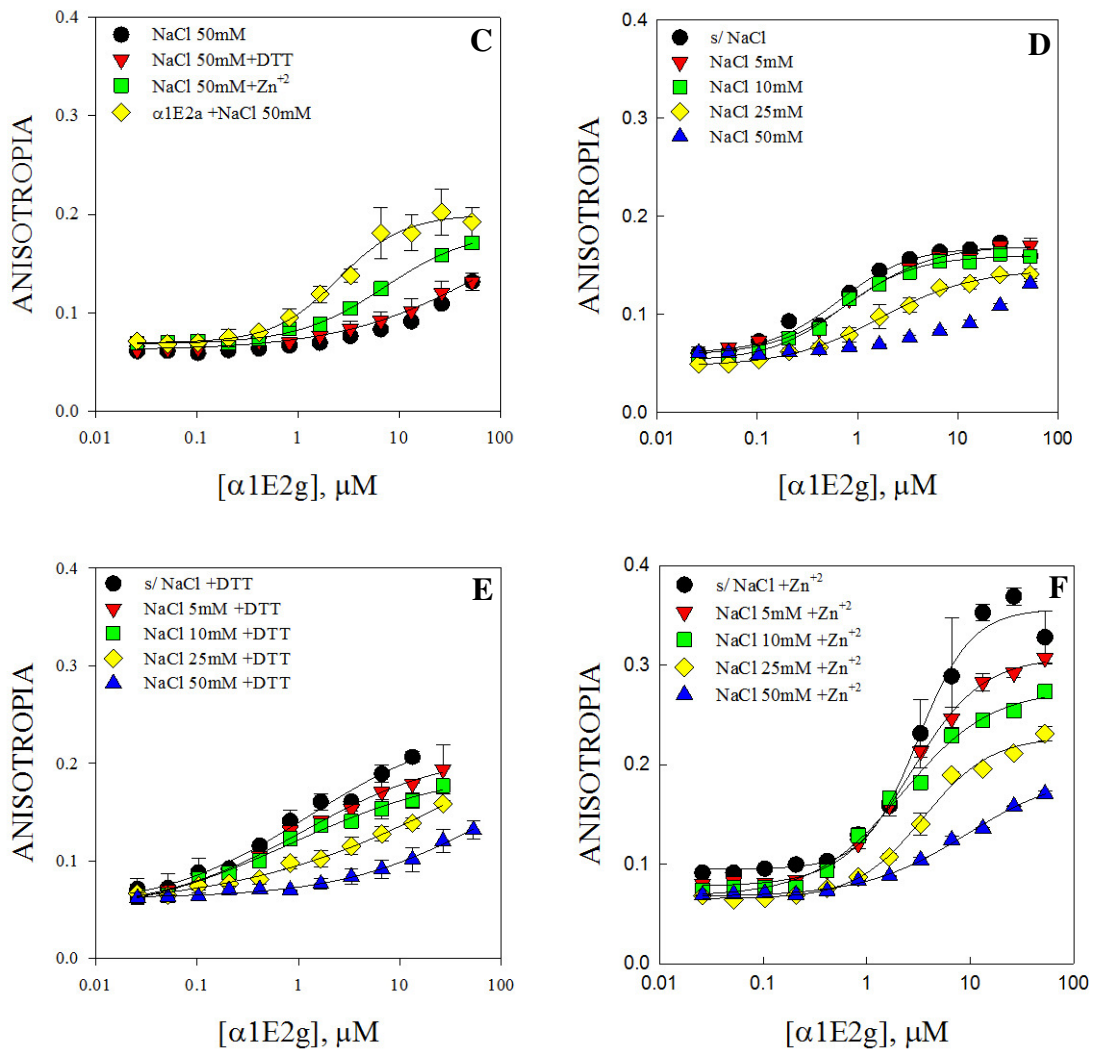
O peptídeo  $\alpha 1E2f$  mostrou perfil de resultados semelhantes aos encontrados para o peptídeo  $\alpha 1E2e$ , com afinidade semelhante ou superior a  $\alpha 1E2a$  por DNA específico, na presença de íons  $Zn^{+2}$  e nas condições testadas (Figuras 28 e 29). O que sugere a importância da coordenação das Histidinas por  $Zn^{+2}$  na afinidade do peptídeo pelo DNA utilizado.

#### 4.3.1.4 Ligação dissulfeto( $Cys_{294}-Cys_{299}$ ) + ligação metálica( $His_{302}-His_{306}$ ): $\alpha 1E2g$

A combinação da ligação dissulfeto do peptídeo  $\alpha 1E2c$  com a ligação metálica do peptídeo  $\alpha 1E2f$  gerou o peptídeo  $\alpha 1E2g$ . A contribuição de tais ligações intramoleculares à afinidade do peptídeo é mostrada nas Figuras 30 e 31.



**Figura 30. Curvas de afinidade de  $\alpha 1E2g$  por DNA específico em diversas condições de meio reacional. (A)** Em meio reacional sem NaCl. **(B)** Na presença de 5mM de NaCl. **(C)** Na presença de 10mM de NaCl. **(D)** Na presença de 25mM de NaCl. Em todos os casos, as curvas de afinidades foram medidas com ou sem adição de DTT a 1mM ou  $ZnCl_2$  a 50 $\mu M$  ao meio reacional.

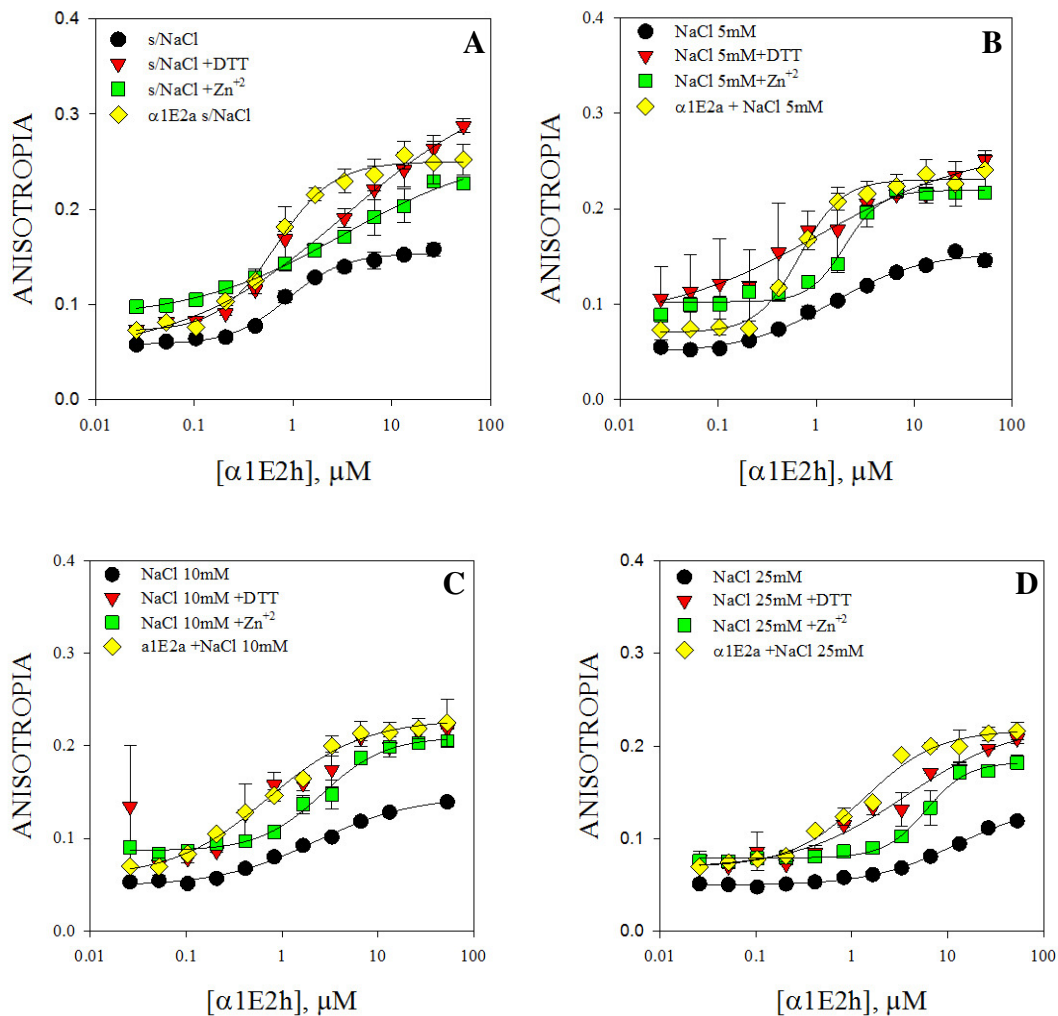


**Figura 31.** Curvas de afinidade de  $\alpha 1E2g$  por DNA específico em diversas condições de meio reacional. (A) Na presença de 10mM de NaCl. (B) Na presença de 25mM de NaCl. (C) Na presença de 50mM de NaCl. De (A) a (C) as curvas de  $\alpha 1E2a$  foram adicionadas para comparação. (D) a (F) Afinidade em razão da força iônica do meio, na ausência (E) ou presença (F) de DTT 1mM ou  $ZnCl_2$  50 $\mu$ M.

O peptídeo  $\alpha 1E2g$  apresentou afinidade inferior ao peptídeo  $\alpha 1E2a$  em todas as condições de força iônica testadas na ausência ou presença do agente redutor DTT (Figuras 30 e 31). Sugerindo que nessa sequência primária, a ligação dissulfeto não interferiu na afinidade do peptídeo pelo DNA específico. Já a adição de íon  $Zn^{+2}$  ao meio reacional aumentou a sua afinidade pelo DNA, sendo ainda assim inferior à afinidade de  $\alpha 1E2a$  pelo mesmo DNA.

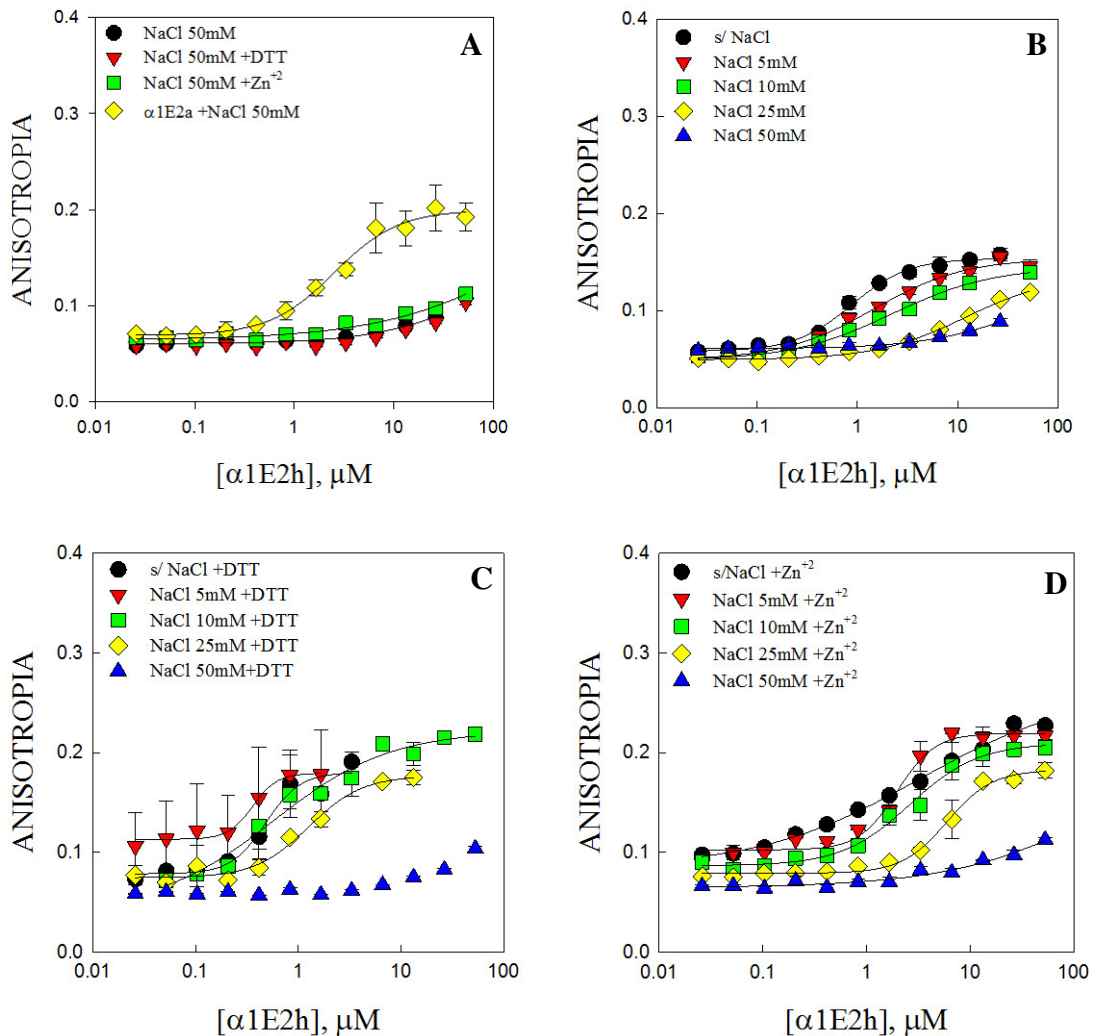
#### 4.3.1.5 Ligação dissulfeto(Cys<sub>294</sub>-Cys<sub>299</sub>) + ligação salina(Asp<sub>302</sub>-Gln<sub>306</sub>): $\alpha 1E2h$

As curvas de afinidade do peptídeo  $\alpha 1E2h$  em diferentes condições de força iônica, com a adição ou não de DTT ou Zn<sup>+2</sup> ao meio reacional, são apresentadas a seguir, nas Figuras 32 e 33.



**Figura 32. Afinidade de  $\alpha 1E2h$  por DNA específico em diversas condições de meio reacional.** (A) Em meio reacional sem NaCl. (B) Na presença de 5mM de NaCl. (C) Na presença de 10mM de NaCl. (D) Na presença de 25mM de NaCl. De (A) a (D) os experimentos foram feitos na presença ou ausência de Zn<sup>+2</sup> a 50 $\mu\text{M}$ . Nos quadros de (A) a (D) foram adicionadas as curvas de afinidade de peptídeo  $\alpha 1Ea(wt)$  para comparação.



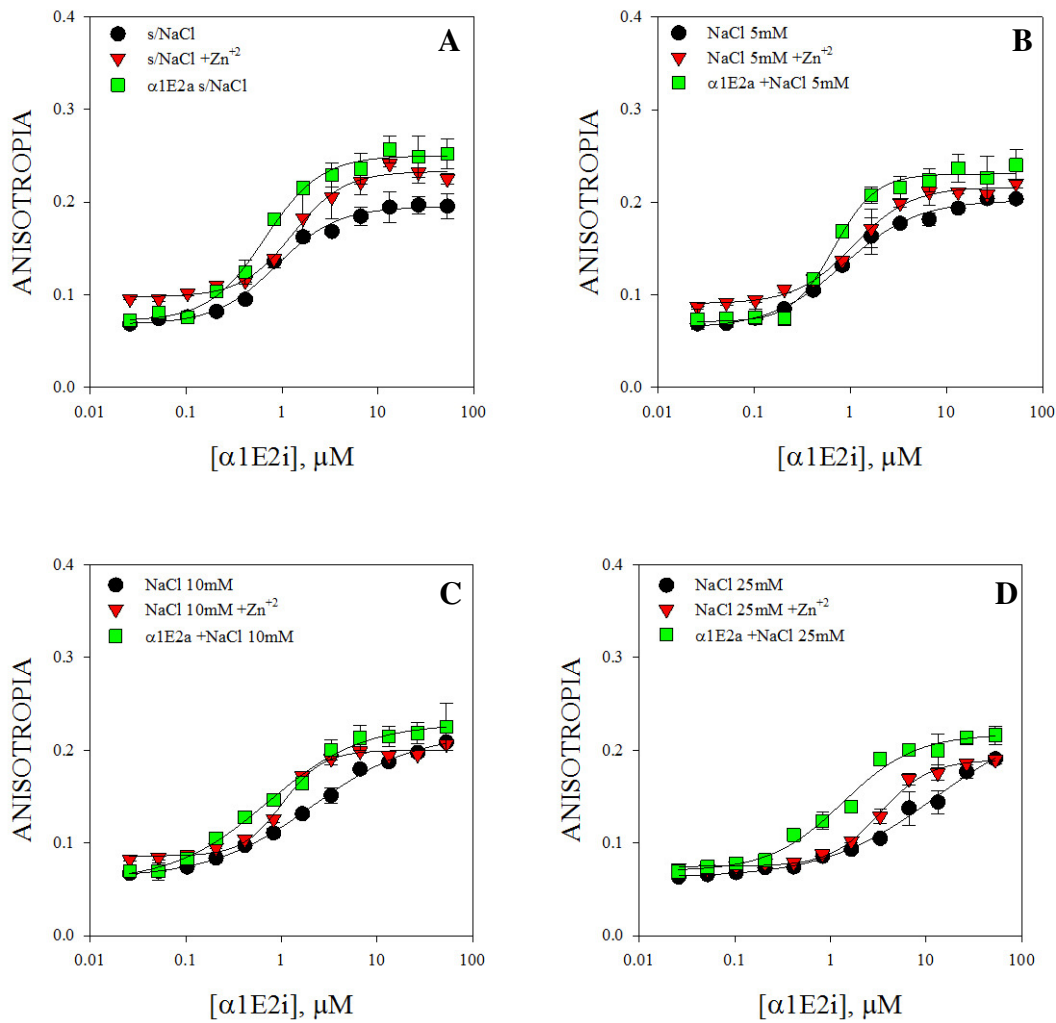


**Figura 33. Comparação entre afinidade de  $\alpha 1E2h$  frente a DNA específico em função da força iônica do meio reacional. (A) Na presença de 50mM de NaCl. (B) Em função da força iônica do meio. (C) Em meio contendo DTT a 1mM. (D) Em meio contendo  $ZnCl_2$  a 50 $\mu$ M.**

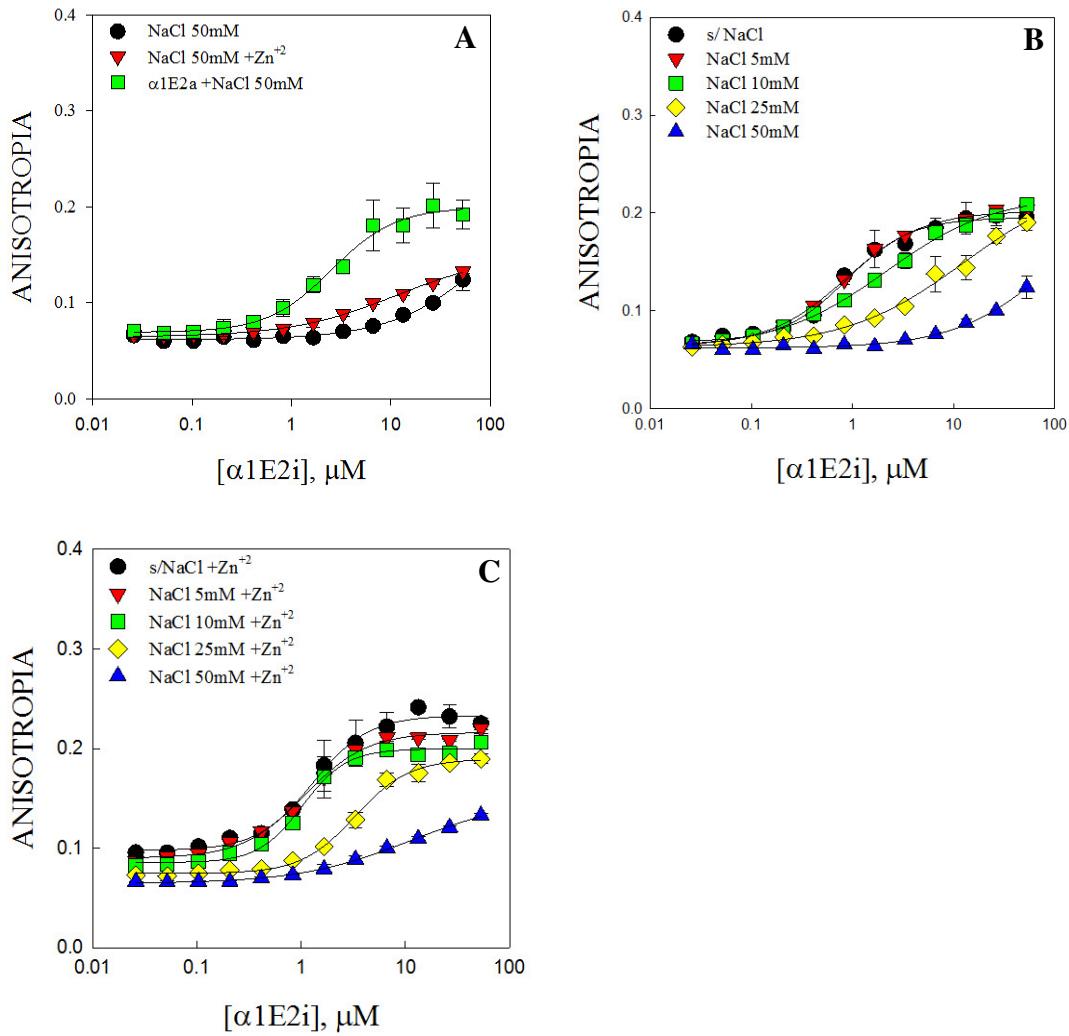
O peptídeo  $\alpha 1E2h$  apresentou curvas de afinidade deslocadas para a direita e com menores valores de anisotropia nas concentrações de platô, se comparadas com as curvas de  $\alpha 1E2a$ . A adição de DTT ou  $Zn^{+2}$  ao meio reacional aumenta a afinidade desse peptídeo pelo DNA específico, mas ainda para valores menores que os obtidos por  $\alpha 1E2a$ .

### 4.3.1.6 Ligação salina (Asn<sub>299</sub>-Asp<sub>302</sub>): $\alpha 1E2i$

São mostrados a seguir os resultados dos ensaios de afinidade do peptídeo  $\alpha 1E2i$ , mutante com uma ligação salina entre os resíduos Asn<sub>299</sub>-Asp<sub>302</sub>, frente a DNA de HPV.



**Figura 34.** Afinidade de  $\alpha 1E2i$  por DNA específico em diferentes condições de meio reacional. (A) Afinidade em meios sem NaCl. (B) Em meios contendo 5mM de NaCl. (C) Meios com 10mM de NaCl. (D) Com 25mM de NaCl. Os ensaios foram realizados na ausência ou presença de  $Zn^{+2}$ . Nos quadros de (A) a (D) foram adicionadas as curvas de afinidade de peptídeo  $\alpha 1Ea(wt)$  para comparação



**Figura 35.** Comparação entre afinidade de  $\alpha 1E2i$  frente a DNA específico em diversas condições de meio reacional. (A) Com 50mM de NaCl. (B) Afinidade em função da força iônica. (C) Afinidade em função da força iônica em meios contendo 50 $\mu M$  de  $ZnCl_2$ .

O peptídeo  $\alpha 1E2i$  mostrou resultados com afinidade inferior a  $\alpha 1E2a$  por DNA de HPV em todas as condições testadas (Figuras 34 e 35).

### 4.3.1.7 Substituição por Alanina: $\alpha 1E2j$ (His<sub>309</sub> por Ala<sub>309</sub>)

A importância da Histidina<sub>309</sub> na afinidade de  $\alpha 1E2a$  foi verificada através do mutante  $\alpha 1E2j$ . Os resultados são mostrados nas Figuras 36 e 37.

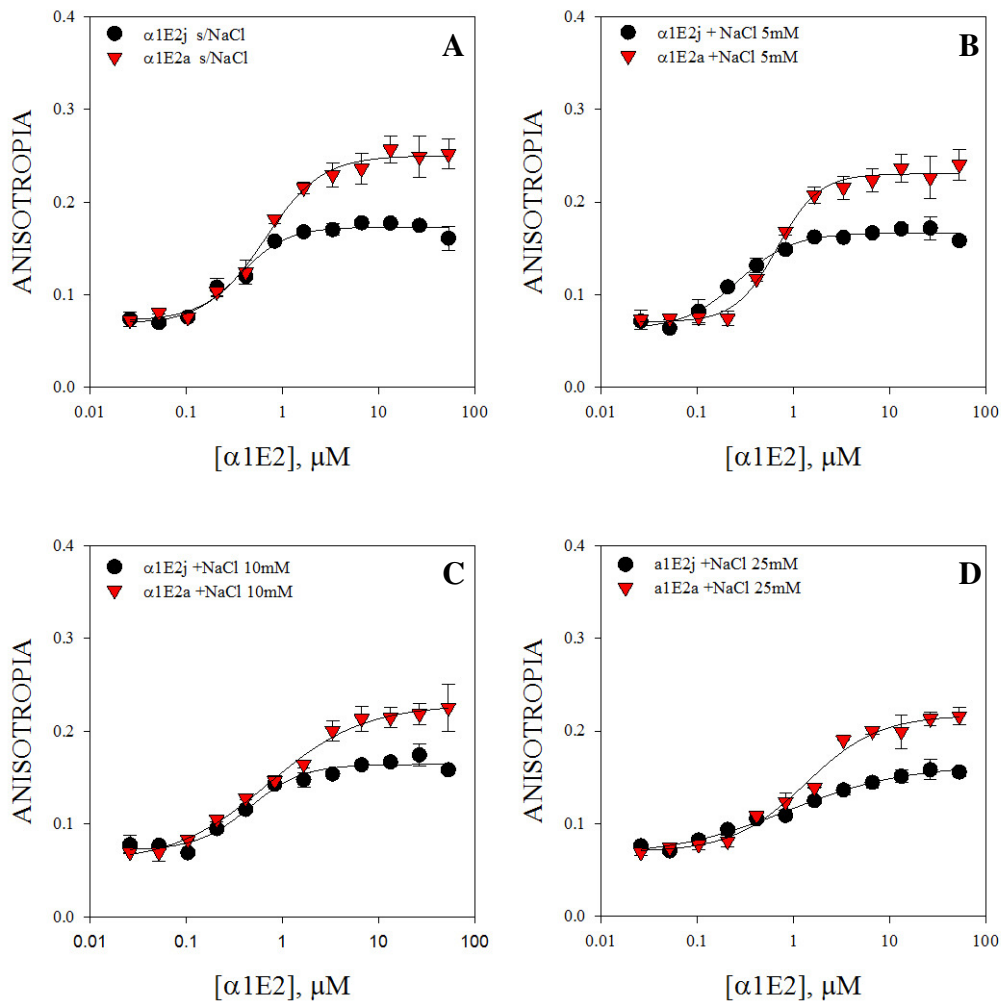
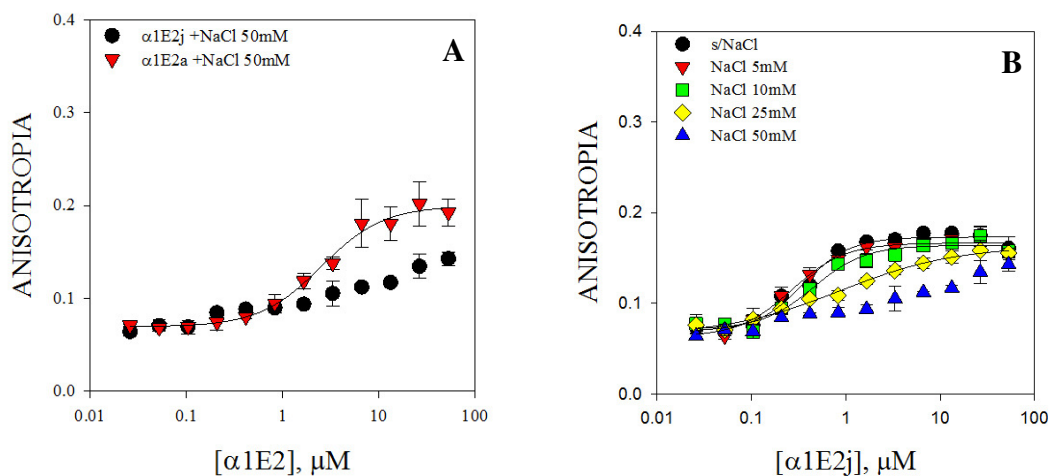


Figura 36. Comparação entre afinidade de  $\alpha 1E2a$  e  $\alpha 1E2j$  por DNA específico de acordo com a força iônica do meio. (A) Em meio sem NaCl. (B) Em NaCl 5mM. (C) Em NaCl 10mM. (D) Em NaCl 25mM.



**Figura 37. Afinidade de  $\alpha 1E2j$  em função da força iônica do meio reacional. (A) Em NaCl 50mM. (B) Afinidade de  $\alpha 1E2j$ , variando-se a força iônica do meio.**

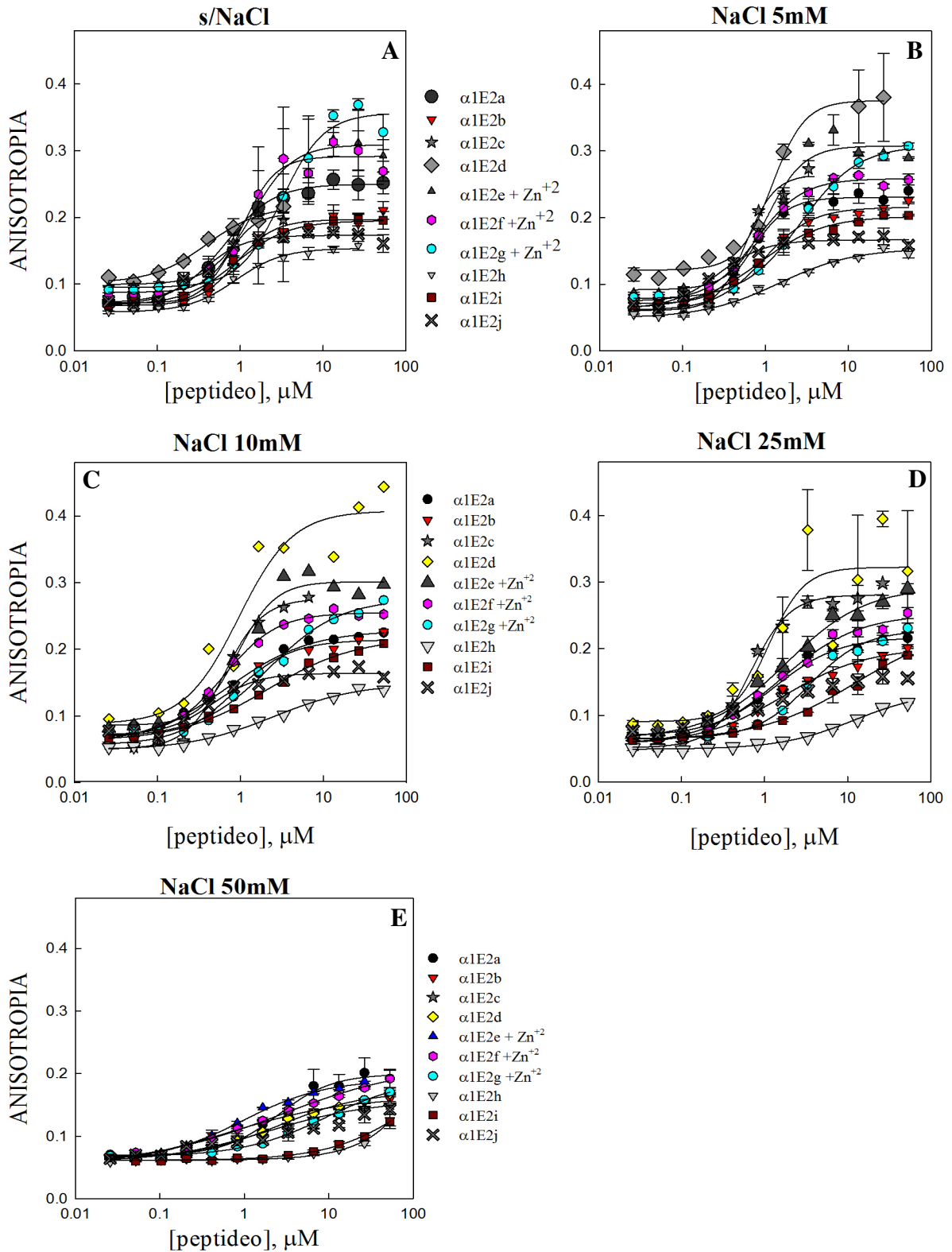
O peptídeo  **$\alpha 1E2j$**  apresentou afinidade semelhante a  $\alpha 1E2a$  por DNA de HPV, deferindo, entretanto, nos valores máximos de anisotropia nas condições de platô das curvas. A semelhança entre as afinidades desses dois peptídeos era esperada, pela diferença apenas na His C-terminal entre eles.

As curvas de afinidade de cada peptídeo contra DNA específico em diferentes condições de meio reacional, mostradas anteriormente, foram fitadas utilizando o formalismo de Hill, descrito na Fórmula 2. Os valores de  $Kd$  encontrados para cada curva são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Constantes de dissociação ( $K_d$ ) dos peptídeos nas diferentes condições de tampão testadas, frente a DNA específico.

$\alpha$ 1E2	Tampão Bistris	$K_d$ ( $\mu$ M)				
		s/NaCl	NaCl 5 mM	NaCl 10 mM	NaCl 25 mM	NaCl 50 mM
<i>a</i> (wt)	+ DTT	0.66 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.11	1.34 $\pm$ 0.22	2.53 $\pm$ 0.32
	+ ZnCl <sub>2</sub>	1.01 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.14	1.11 $\pm$ 0.15	1.82 $\pm$ 0.16	> 50 $\mu$ M
<i>b</i>	----	0.90 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.12	1.67 $\pm$ 0.35	0.67 $\pm$ 0.24
	+ ZnCl <sub>2</sub>	1.09 $\pm$ 0.11	0.84 $\pm$ 0.08	0.74 $\pm$ 0.11	1.65 $\pm$ 0.77	1.35 $\pm$ 0.22
<i>c</i>	----	0.68 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.05	0.69 $\pm$ 0.06	1.87 $\pm$ 0.40
	+ DTT	0.53 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.23	1.12 $\pm$ 0.43	1.50 $\pm$ 0.43	> 50 $\mu$ M
	+ ZnCl <sub>2</sub>	1.50 $\pm$ 0.18	1.25 $\pm$ 0.10	1.23 $\pm$ 0.27	1.64 $\pm$ 0.16	3.59 $\pm$ 0.76
<i>d</i>	----	0.39 $\pm$ 0.08	1.20 $\pm$ 0.11	0.69 $\pm$ 0.25	1.13 $\pm$ 0.49	2.64 $\pm$ 0.36
	+ DTT	0.47 $\pm$ 0.16	0.22 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.21	1.42 $\pm$ 0.21.14	> 50 $\mu$ M
	+ ZnCl <sub>2</sub>	1.36 $\pm$ 0.19	0.99 $\pm$ 0.15	0.88 $\pm$ 0.11	2.75 $\pm$ 0.26	9.0 $\pm$ 1.89
<i>e</i>	----	0.36 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.10	0.91 $\pm$ 0.15	3.93 $\pm$ 1.91
	+ ZnCl <sub>2</sub>	1.40 $\pm$ 0.15	1.04 $\pm$ 0.16	0.92 $\pm$ 0.12	1.84 $\pm$ 0.28	0.97 $\pm$ 0.12
<i>f</i>	----	0.26 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.07	15.41 $\pm$ 16.68
	+ ZnCl <sub>2</sub>	1.09 $\pm$ 0.14	0.77 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.04	1.57 $\pm$ 0.23	2.68 $\pm$ 0.78
<i>g</i>	----	0.66 $\pm$ 0.13	0.91 $\pm$ 0.13	0.70 $\pm$ 0.06	1.69 $\pm$ 0.15	> 50 $\mu$ M
	+ DTT	1.25 $\pm$ 0.77	1.11 $\pm$ 0.29	0.84 $\pm$ 0.32	> 50 $\mu$ M	> 50 $\mu$ M
	+ ZnCl <sub>2</sub>	3.13 $\pm$ 0.37	2.69 $\pm$ 0.14	2.21 $\pm$ 0.31	3.52 $\pm$ 0.38	9.20 $\pm$ 1.84
<i>h</i>	----	0.88 $\pm$ 0.08	1.46 $\pm$ 0.22	2.48 $\pm$ 0.43	12.02 $\pm$ 2.29	> 50 $\mu$ M
	+ DTT	3.39 $\pm$ 2.18	1.10 $\pm$ 0.56	0.58 $\pm$ 0.29	3.67 $\pm$ 1.70	> 50 $\mu$ M
	+ ZnCl <sub>2</sub>	3.24 $\pm$ 1.02	1.96 $\pm$ 0.22	2.62 $\pm$ 0.32	5.96 $\pm$ 0.49	> 50 $\mu$ M
<i>i</i>	----	0.87 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.08	2.13 $\pm$ 0.21	12.62 $\pm$ 6.10	> 50 $\mu$ M
	+ ZnCl <sub>2</sub>	1.29 $\pm$ 0.12	1.08 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.08	3.29 $\pm$ 0.22	11.36 $\pm$ 2.12
<i>j</i>	+ DTT	0.35 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.08	0.88 $\pm$ 0.20	> 50 $\mu$ M

As curvas de afinidade dos peptídeos foram agrupadas considerando-se as condições de meio reacional otimizadas para a(s) mutação(ões) de cada peptídeo, a fim de comparar suas afinidades por DNA específico (Figura 38).



**Figura 38.** Curvas de afinidade dos análogos de  $\alpha 1E2$  nas condições planejadas de meio reacional, variando-se a força iônica do meio. (A) Sem NaCl (B) Em NaCl 5mM (C) Em NaCl 10mM (D) Em NaCl 25mM (E) Em NaCl 50mM.

Considerando-se apenas as condições otimizadas de meio reacional para cada peptídeo, de acordo com a(s) sua(s) ligação(ões) intramolecular(es), as constantes de dissociação foram, então, agrupadas e tratadas estatisticamente com o testes *t* não pareado bicaudal, conforme descrito na seção *Metodologia*, para formar a Tabela 13. Os valores de *K<sub>d</sub>* diferentes estatisticamente dos valores de *K<sub>d</sub>* do peptídeo  $\alpha$ 1E2a são mostrados em **negrito**, com seus respectivos *p* com um asterisco (\*) afrente do valor.

**Tabela 13. Constantes de dissociação (*K<sub>d</sub>*) dos peptídeos nas condições planejadas de tampão testadas, frente a DNA específico**

$\alpha$ 1E2	Tampão Bistris	<i>K<sub>d</sub></i> ( $\mu$ M) DNA HPV									
		<i>s/NaCl</i>	<i>p</i>	<i>NaCl 5 mM</i>	<i>p</i>	<i>NaCl 10 mM</i>	<i>p</i>	<i>NaCl 25 mM</i>	<i>p</i>	<i>NaCl 50 mM</i>	<i>p</i>
<i>a</i>	+ DTT	0,66 ± 0,06	---	0,68 ± 0,05	---	0,71 ± 0,11	---	1,34 ± 0,22	---	2,53 ± 0,32	---
<i>b</i>	----	0,90 ± 0,11	(0,196)	0,96 ± 0,08	(0,097)	0,83 ± 0,12	(0,538)	1,67 ± 0,35	(0,508)	<b>0,67 ± 0,24</b>	<b>*(0,043)</b>
<i>c</i>	----	0,68 ± 0,07	(0,848)	0,59 ± 0,06	(0,368)	1,01 ± 0,28	(0,621)	0,69 ± 0,06	(0,104)	1,87 ± 0,40	(0,327)
<i>d</i>	----	0,39 ± 0,08	(0,114)	<b>1,20 ± 0,11</b>	<b>*(0,050)</b>	0,69 ± 0,25	(0,948)	1,13 ± 0,49	(0,734)	2,64 ± 0,36	(0,841)
<i>e</i>	+ ZnCl <sub>2</sub>	<b>1,40 ± 0,15</b>	<b>*(0,045)</b>	1,04 ± 0,16	(0,165)	0,92 ± 0,12	(0,326)	1,84 ± 0,28	(0,295)	<b>0,97 ± 0,12</b>	<b>*(0,045)</b>
<i>f</i>	+ ZnCl <sub>2</sub>	1,09 ± 0,14	(0,106)	0,77 ± 0,05	(0,331)	0,64 ± 0,04	(0,611)	1,57 ± 0,23	(545)	2,68 ± 0,78	(0,875)
<i>g</i>	+ ZnCl <sub>2</sub>	<b>3,13 ± 0,37</b>	<b>*(0,022)</b>	<b>2,69 ± 0,14</b>	<b>*(0,005)</b>	<b>2,21 ± 0,31</b>	<b>*(0,045)</b>	<b>3,52 ± 0,38</b>	<b>*(0,039)</b>	<b>7,28 ± 0,89</b>	<b>*(0,037)</b>
<i>h</i>	----	0,88 ± 0,08	(0,159)	1,46 ± 0,22	(0,074)	<b>2,24 ± 0,34</b>	<b>*(0,049)</b>	<b>12,02 ± 2,29</b>	<b>*(0,043)</b>	> 50 $\mu$ M	<b>*(0,00004)</b>
<i>i</i>	----	0,87 ± 0,09	(0,192)	0,86 ± 0,08	(0,197)	<b>2,13 ± 0,21</b>	<b>*(0,027)</b>	12,62 ± 6,10	(0,206)	> 50 $\mu$ M	<b>*(0,00004)</b>
<i>j</i>	+ DTT	0,35 ± 0,05	(0,058)	<b>0,27 ± 0,04</b>	<b>*(0,024)</b>	0,45 ± 0,08	(0,196)	0,88 ± 0,20	(0,262)	> 50 $\mu$ M	<b>*(0,00004)</b>

As *K<sub>d</sub>* das curvas de afinidade listadas na Tabela 13 são mostradas num gráfico de dispersão, de acordo com a força iônica do meio reacional, na Figura 39. Em uma condição de baixa força iônica do meio, mimetizada pela ausência de NaCl, interações inespecíficas e específicas contribuem para a afinidade dos peptídeos pelo DNA específico. Nessa condição, basicamente todos os peptídeos apresentaram *K<sub>d</sub>* semelhantes, exceto  $\alpha$ 1E2e e  $\alpha$ 1E2g em meio contendo Zn<sup>+2</sup>, que apresentaram *K<sub>d</sub>* maiores que  $\alpha$ 1E2a. Aumentando-se a força iônica do meio, diminuem-se as interações inespecíficas, pela presença de contra íons Na<sup>+</sup> junto aos grupos fosfato do DNA, diminuindo as interações eletrostáticas inespecíficas com esses grupos. Esse aumento de força iônica facilitaria evidenciar diferenças de afinidade entre os peptídeos



pelo DNA consenso. Em NaCl 5mM, os peptídeos  $\alpha 1E2d$  e  $\alpha 1E2g$  apresentaram  $Kd$  maiores que  $\alpha 1E2a$ , enquanto que  $\alpha 1E2j$  obteve  $Kd$  menor que  $\alpha 1E2a$ . Em 10mM de NaCl, as  $Kd$  de  $\alpha 1E2g$ ,  $\alpha 1E2h$  e  $\alpha 1E2i$  apresentaram-se maiores que a  $Kd$  de  $\alpha 1E2a$ . Porém, tais condições de meio reacional ainda são considerados como de baixa força iônica. Em 25mM de NaCl, as  $Kd$  dos peptídeos  $\alpha 1E2g$  e  $\alpha 1E2h$  mostraram-se superiores a  $Kd$  de  $\alpha 1E2a$ . Apesar do peptídeo  $\alpha 1E2i$  também apresentar valor de  $Kd$  aparentemente superior a  $Kd$  de  $\alpha 1E2a$ , essa diferença não foi significativa pelo teste  $t$  bicaudal não pareado, provavelmente pelo grande desvio padrão apresentado por esse peptídeo em 50mM de NaCl.

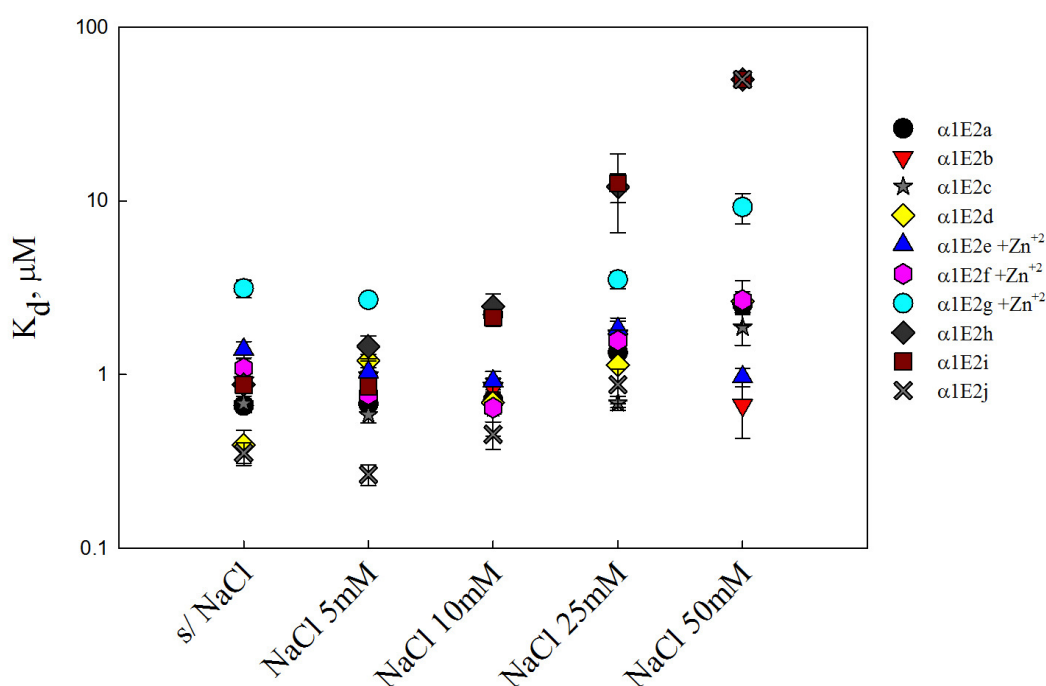
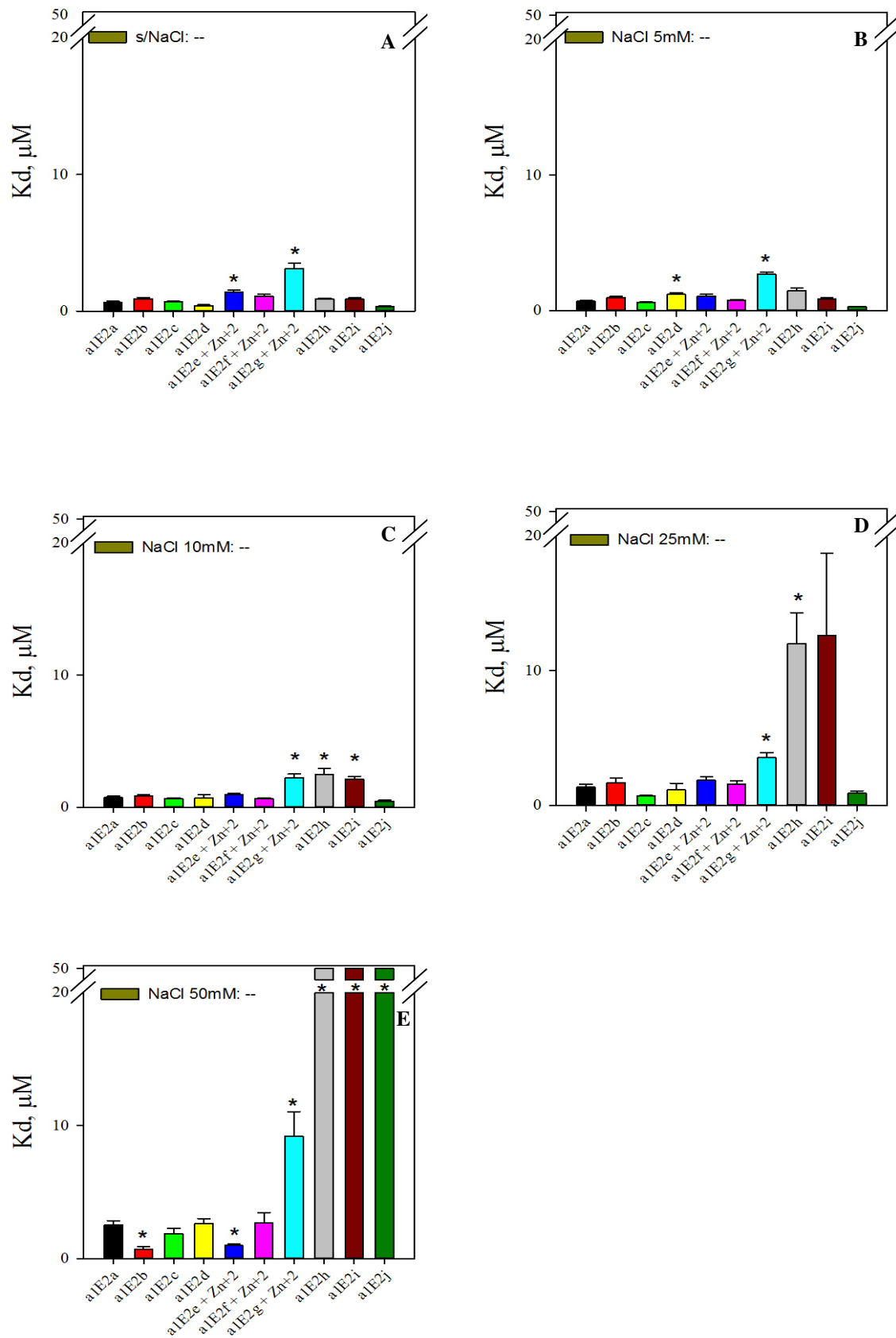


Figura 39. Comparação entre as constantes de dissociação ( $Kd$ ) dos diferentes peptídeos nas condições de tampão planejadas, frente a DNA específico, variando-se a força iônica do meio.

As  $Kd$  de todos os peptídeos nas condições otimizadas de meio reacional, constantes na Tabela 13, foram transformadas em um gráfico de barras. Diferenças de  $Kd$  maiores de 5% em relação a  $Kd$  de  $\alpha 1E2a$  foram consideradas significativas ( $p > 0,05$ ), sendo representadas pelo (\*) na Figura 40.



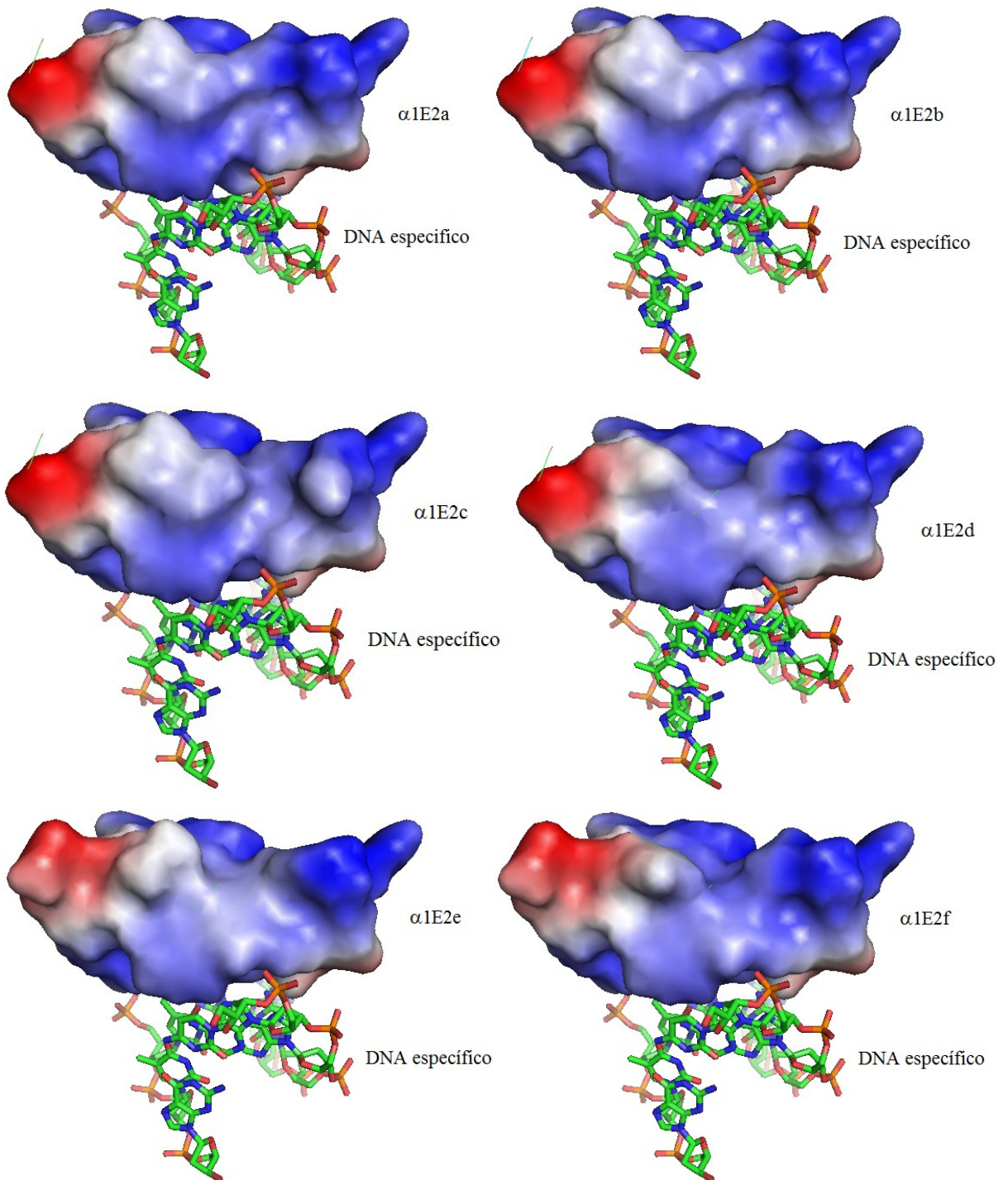
**Figura 40.** Comparação das constantes de dissociação ( $K_d$ ) entre os peptídeos e DNA específico nas condições reacionais planejadas, em função da força iônica do meio. (A) Em meio sem NaCl. (B) Em meio com NaCl 5mM. (C) Em NaCl 10mM. (D) Em NaCl 25mM. (E) Em NaCl 50mM.

O reagente DTT é um agente redutor utilizado na concentração de 1mM para manter o átomo de enxofre (S) de resíduos de Cys na forma reduzida de grupo tiol (SH) (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006; GIESEL *et al.*, 2008). As soluções dos peptídeos contendo 1 Cys na sua sequência primária foram acrescidas de 1 mM de DTT para proteção do grupo tiol dessa Cys. No caso dos peptídeos com 2 Cys na sequência primária formando uma ligação dissulfeto, foi adicionado DTT ao meio reacional para romper essa ligação dissulfeto intramolecular e verificar uma possível alteração de afinidade do peptídeo nessa condição.

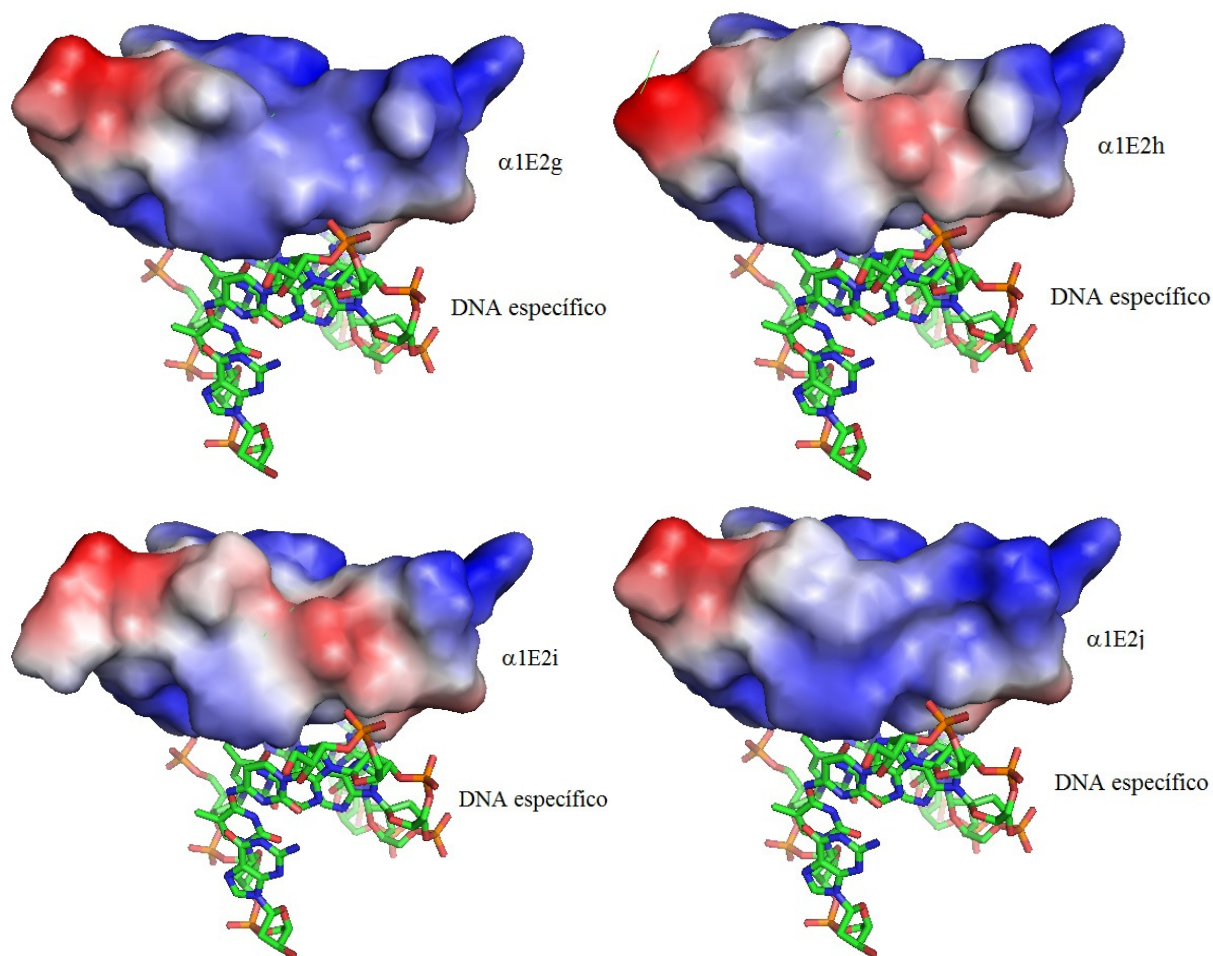
As mutações de  $\alpha$ 1E2a foram propostas para gerar peptídeos com maiores afinidade e seletividade pelo DNA de HPV em condições específicas. Assim, os peptídeos com ligação dissulfeto entre duas Cys da sua sequência primária foram projetados para terem melhor desempenho em tampões sem DTT, pelos resíduos de Cys estarem no estado oxidado quando formam a ligação dissulfeto. Os peptídeos  $\alpha$ 1E2a e  $\alpha$ 1E2j, que possuem apenas 1 resíduo de Cys, foram testados em tampões com DTT, para evitar a formação de ligações dissulfeto intermoleculares. Os mutantes com ligações metálicas foram otimizados para tampões com  $ZnCl_2$ , para coordenação de dois resíduos de His com o íon  $Zn^{+2}$ . Os peptídeos foram titulados em soluções tampão com e sem os reagentes supra citados (DTT e/ou  $ZnCl_2$ ), para se investigar a contribuição das mutações propostas nesse trabalho.

A adição de DTT ao meio reacional contendo os peptídeos  **$\alpha$ 1E2c**,  **$\alpha$ 1E2d** ou  **$\alpha$ 1E2g** visava o rompimento da ligação dissulfeto intramolecular, por reduzir os resíduos de Cys, permitindo-se verificar a contribuição dessa ligação dissulfeto à afinidade do peptídeo pelo DNA utilizado. Os resultados das titulações também mostraram diminuição da afinidade de tais peptídeos pelo DNA de HPV, pelo deslocamento para a direita das curvas e consequente aumento dos valores de  $Kd$  (Figuras 22, 23, 24, 25, 30 e 31, e Tabela 12).

Tentando explicar as diferenças de afinidade encontradas entre os peptídeos e o DNA específico foi visualizado o mapa de densidade eletrostática de cada peptídeo, através do programa *Pymol*, encontrando-se os seguintes mapas:



**Figura 41.** Mapas de densidade eletrostática dos peptídeos  $\alpha 1E2a$  a  $\alpha 1E2f$  ligados a DNA de HPV18. Em azul estão representadas as regiões eletropositivas e em vermelho as regiões eletronegativas.



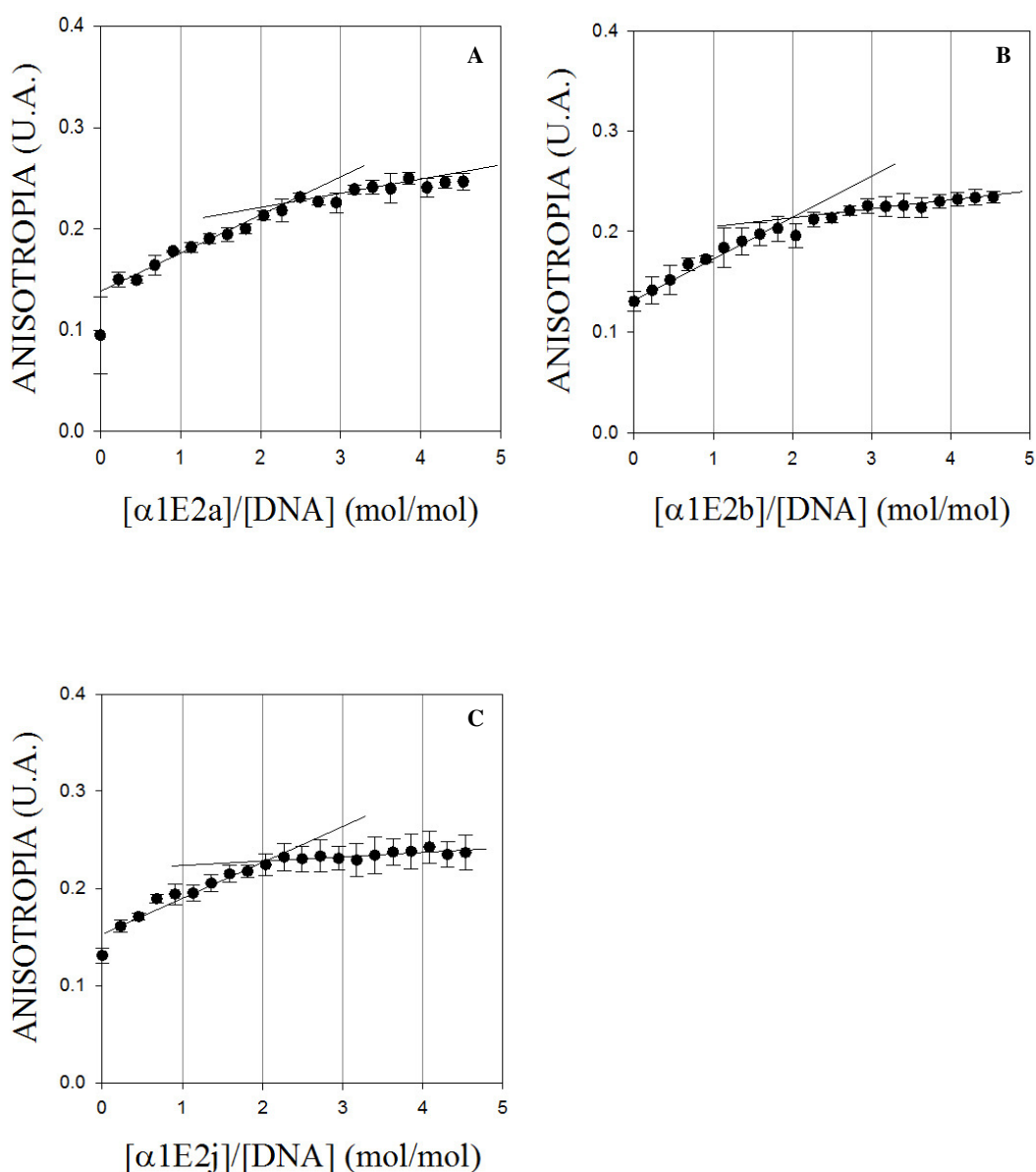
**Figura 42.** Mapas de densidade eletrostática dos peptídeos  $\alpha 1E2g$  a  $\alpha 1E2j$  ligados a DNA de HPV18. Em azul estão representadas as regiões eletropositivas e em vermelho as regiões eletronegativas.

As Figuras 41 e 42 mostram os mapas de densidade eletrostática de  $\alpha 1E2a$ , bem como de cada um dos 9 peptídeos mutantes, ligados a DNA de HPV18. Em geral, há pouca alteração de cargas entre os peptídeos, exceto  $\alpha 1E2h$  e  $\alpha 1E2i$ , que apresentaram aumento de carga eletronegativa em regiões próximas aos grupos  $PO_4^{-3}$  do DNA. A proximidade entre essas regiões eletronegativas dos peptídeos e os grupos fosfato do esqueleto do DNA poderia levar a uma repulsão local entre tais ligantes, interferindo na afinidade de tais peptídeos pelo DNA específico. O que explicaria as  $Kd$  encontradas para  $\alpha 1E2i$  e  $\alpha 1E2j$ , tão diferentes que as dos demais peptídeos análogos de  $\alpha 1E2a$ .

### 4.3.2 ESTEQUIOMETRIA DAS LIGAÇÕES

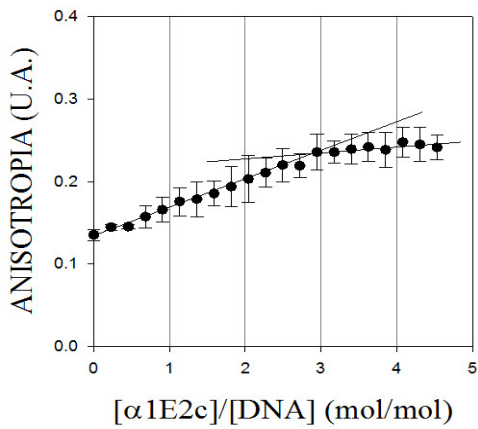
Os resultados das titulações estequiométricas dos peptídeos frente a DNA específico são mostrados com adição de linhas de tendência para as inclinações da curva obtida (Figuras 41, 42 e 43). Os resultados foram agrupados de acordo com a estequiometria obtida.

#### Estequiometria aproximada de 2 moles<sub>peptídeo</sub>: 1 mol<sub>DNA</sub>



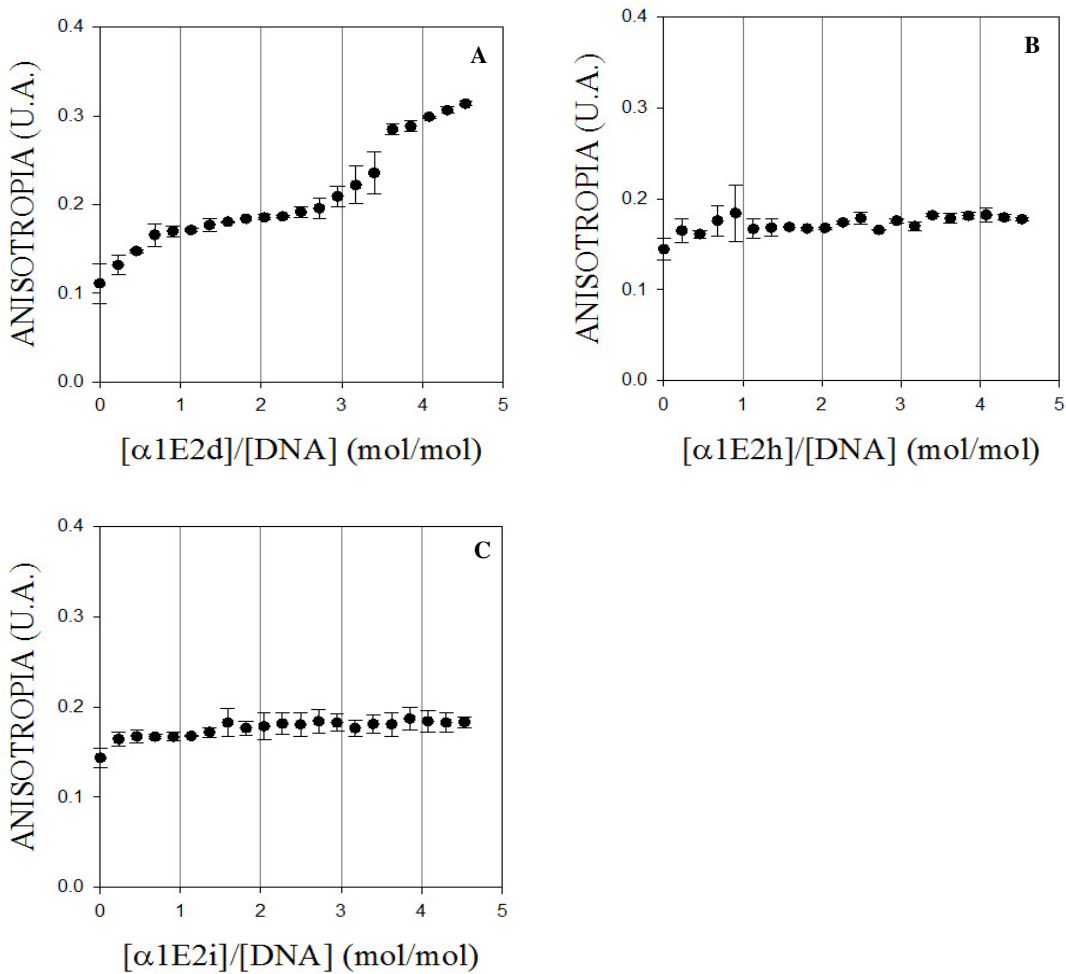
**Figura 43. Curvas com Estequiometria de 2 moles<sub>peptídeo</sub>: 1 mol<sub>DNA</sub> . A)  $\alpha 1E2a$ . B)  $\alpha 1E2b$ . C)  $\alpha 1E2j$ . A linha de tendência sugere estequiometria de 2 moles<sub>peptídeo</sub> para 1 mol<sub>DNAespecífico</sub>. As titulações estequiométricas dos peptídeos  $\alpha 1E2a$  e  $\alpha 1E2j$  foram realizadas em meio contendo DTT.**

### ESTEQUIOMETRIA APROXIMADA DE 3 moles<sub>peptídeo</sub>: 1 mol<sub>DNA</sub>



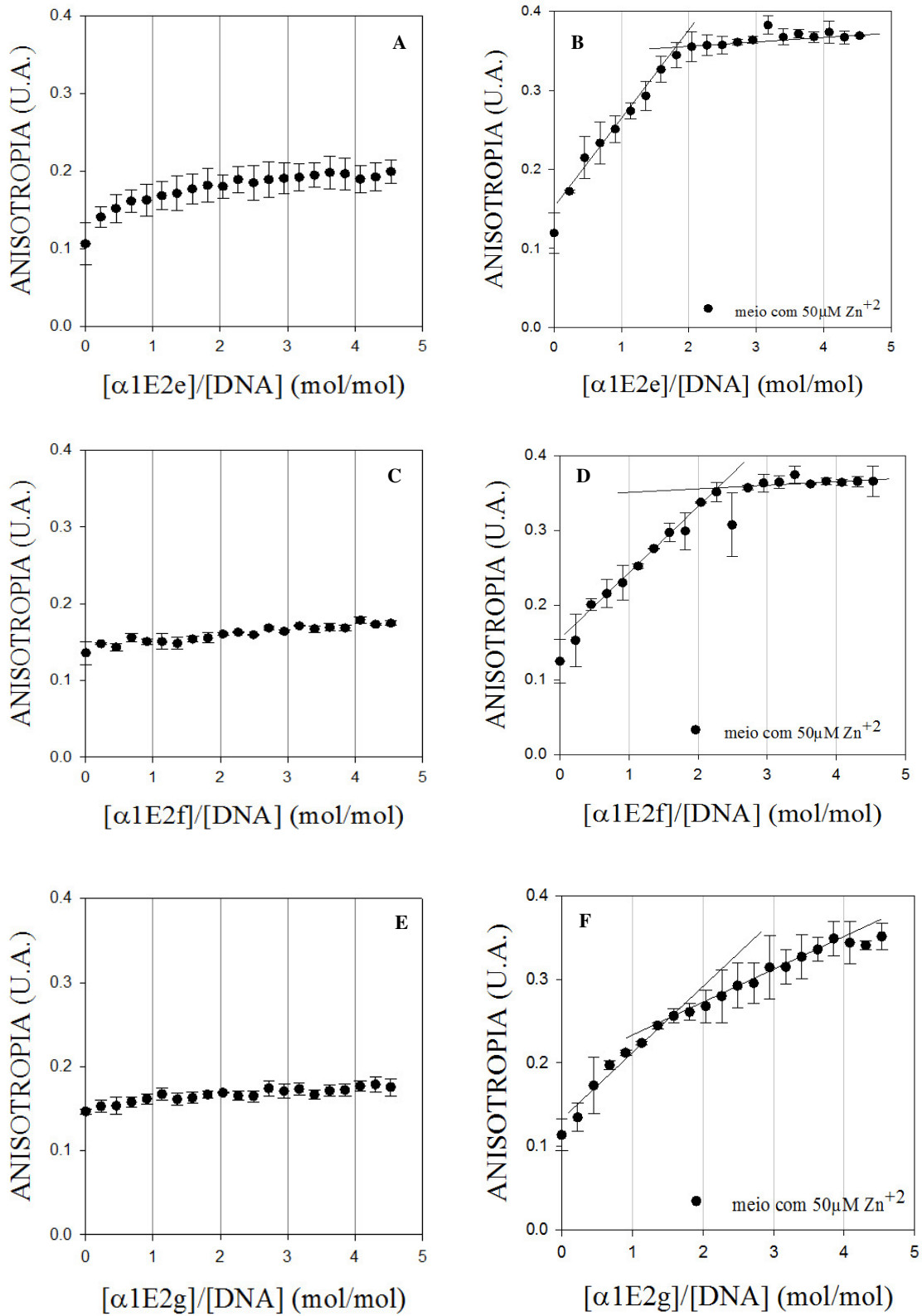
**Figura 44.** Curva com Estequiometria de 3 moles<sub>peptídeo</sub>: 1 mol<sub>DNA</sub> :  $\alpha 1E2c$ . A linha de tendência sugere estequiometria de 3 moles<sub>peptídeo</sub> para 1 mol<sub>DNA</sub> específico.

### ESTEQUIOMETRIA INDEFINIDA



**Figura 45.** Curvas com Estequiometrias indefinidas frente a DNA específico:  $\alpha 1E2d$ ,  $\alpha 1Eh$  e  $\alpha 1E2i$ . Foi utilizada uma solução contendo 25 nM de DNA específico marcado com fluoresceína, 5  $\mu$ M de DNA específico sem fluoresceína, 5 mM de NaCl e 10mM de Bistris.

### ESTEQUIOMETRIA DEPENDENTE DA PRESENÇA DE ÍONS $Zn^{+2}$



**Figura 46.** Estequiometria da ligação de  $\alpha 1E2e$  e  $\alpha 1E2g$  frente a DNA específico. Utilizou-se uma solução de 25 nM de DNA específico com fluoresceína, 5  $\mu M$  de DNA específico sem fluoresceína, 5 mM de NaCl e 10mM de Bistris. Nos quadros (B), (D) e (F) foram adicionados 50  $\mu M ZnCl_2$ . Os peptídeos foram adicionados de 1 em 1  $\mu L$ , de uma solução de 20  $\mu L$  a 20  $\mu M$ . Os quadros (B), (D) e (F) mostram a mudança de perfil estequiométrico com a adição de  $Zn^{+2}$  ao meio reacional.



Nos ensaios de estequiometria, o peptídeo foi adicionado aos poucos a uma solução contendo mistura de DNA específico ligado e não ligado à fluoresceína, estando o DNA não ligado à fluoresceína em concentração 200 vezes maior que a do ligado, e 5 vezes maior que a  $Kd$  referente à interação entre esse DNA e  $\alpha 1E2a$ . Tal concentração de DNA não marcado com fluoresceína geraria uma condição de saturação de reagente – DNA – que tenderia a reação em favor da formação do complexo DNA-peptídeo, ou seja; a interação do peptídeo com o DNA ocorreria acima da  $Kd$  da interação. O DNA marcado serviria apenas de indicador da interação entre DNA não marcado e o peptídeo. Em concentrações do peptídeo menores que a necessária para atingir o ponto estequiométrico da interação, a reação ocorreria de forma mais rápida, o que pode ser identificado por uma inclinação maior da linha de tendência da reação. O ponto estequiométrico é o momento da reação em que os reagentes estão em concentrações proporcionais. Ele é também chamado de ponto final da reação. Após esse momento, a reação tende a atingir um equilíbrio dinâmico, o qual é visto pela mudança da inclinação da linha de tendência da reação, formando um platô.

Os peptídeos  **$\alpha 1E2a$** ,  **$\alpha 1E2b$**  e  **$\alpha 1E2j$**  apresentaram estequiometria de aproximadamente 2 moles de peptídeo reagindo com 1 mol de DNA (Figura 43). Em acordo com dados mostrados na literatura (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006). Resultado que era esperado, devido à semelhança entre tais peptídeos, apenas com mutações pontuais em relação a  $\alpha 1E2a$ , como a substituição da Cys<sub>301</sub> por Ser, ou da His<sub>309</sub> na região C-terminal por Ala.

O peptídeo  **$\alpha 1E2c$**  obteve estequiometria de 3 moles de peptídeo para 1 mol de DNA (Figura 44). Sugerindo que sua interação com DNA de HPV ocorra também em outra região do DNA, além da sequência palíndromo de reconhecimento.

O mutante  **$\alpha 1E2d$**  obteve perfil diferente dos demais nos ensaios estequiométricos, com a presença de dois platôs, sugerindo que a sua interação com DNA específico ocorra em dois estágios diferentes, proporcionais à concentração do peptídeo. (Figura 45) O que pode ser devido à tendência à agregação em altas concentrações de peptídeo, ou que sua interação com DNA de HPV ocorra por uma dinâmica diferente dos demais peptídeos.

Os mutantes  **$\alpha 1E2e$** ,  **$\alpha 1E2f$**  e  **$\alpha 1E2g$**  apresentaram estequiometria indefinida num meio reacional sem Zn<sup>+2</sup> (Figura 46). A adição de ZnCl<sub>2</sub> visando à coordenação das His dos peptídeos gerou alteração do perfil estequiométrico de  $\alpha 1E2e$  e  $\alpha 1E2f$  para 2 moles de peptídeo para cada mol de DNA. A estequiometria de ligação de  $\alpha 1E2g$  também sofreu alteração com a adição de Zn<sup>+2</sup> ao meio reacional, passando de indeterminada a 1 mol de

peptídeo para 1 mol de DNA. Tal estequiometria não era esperada, pela semelhança nos valores de  $Kd$  entre a maioria dos peptídeos e  $\alpha 1E2a$  (Figura 46 e Tabela 12), o que sugeriria perfis semelhantes de estequiometria de ligação.

Os peptídeos  $\alpha 1E2h$  e  $\alpha 1E2i$  apresentaram estequiometria indefinida, que pode ser devida à concentração de DNA não marcado com fluoresceína ( $5\mu M$ ) ser menor que 5 vezes a  $Kd$  da interação entre esses peptídeos e o DNA específico. Considerando os mapas de densidade eletrostática de tais peptídeos (Figura 45), a maior proximidade entre regiões eletronegativas desses peptídeos do esqueleto do DNA pode ter ocasionado a diminuição de afinidade entre tais ligantes.

#### 4.4 LIGAÇÃO $\alpha 1E2$ x DNA NÃO ESPECÍFICO

Seguem os resultados das interações entre os peptídeos e DNAs não específicos A e B.

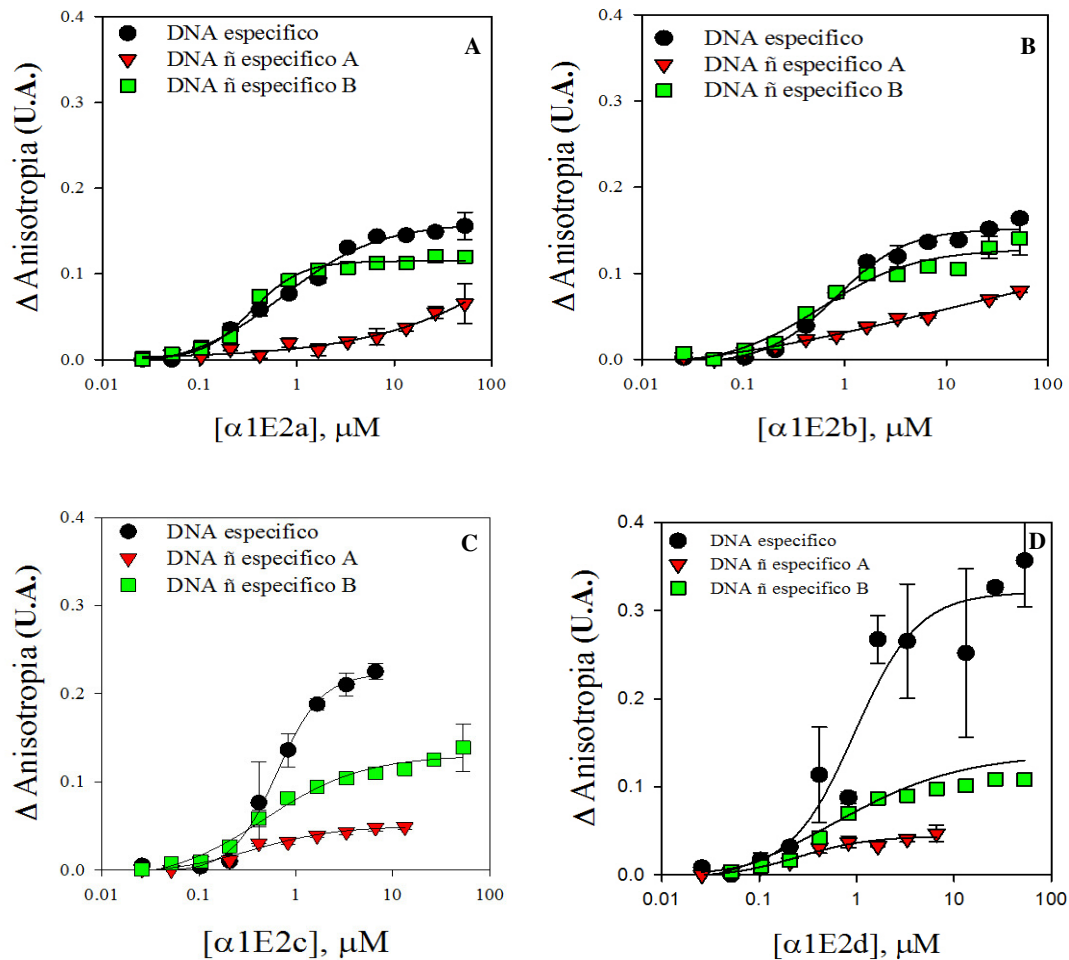
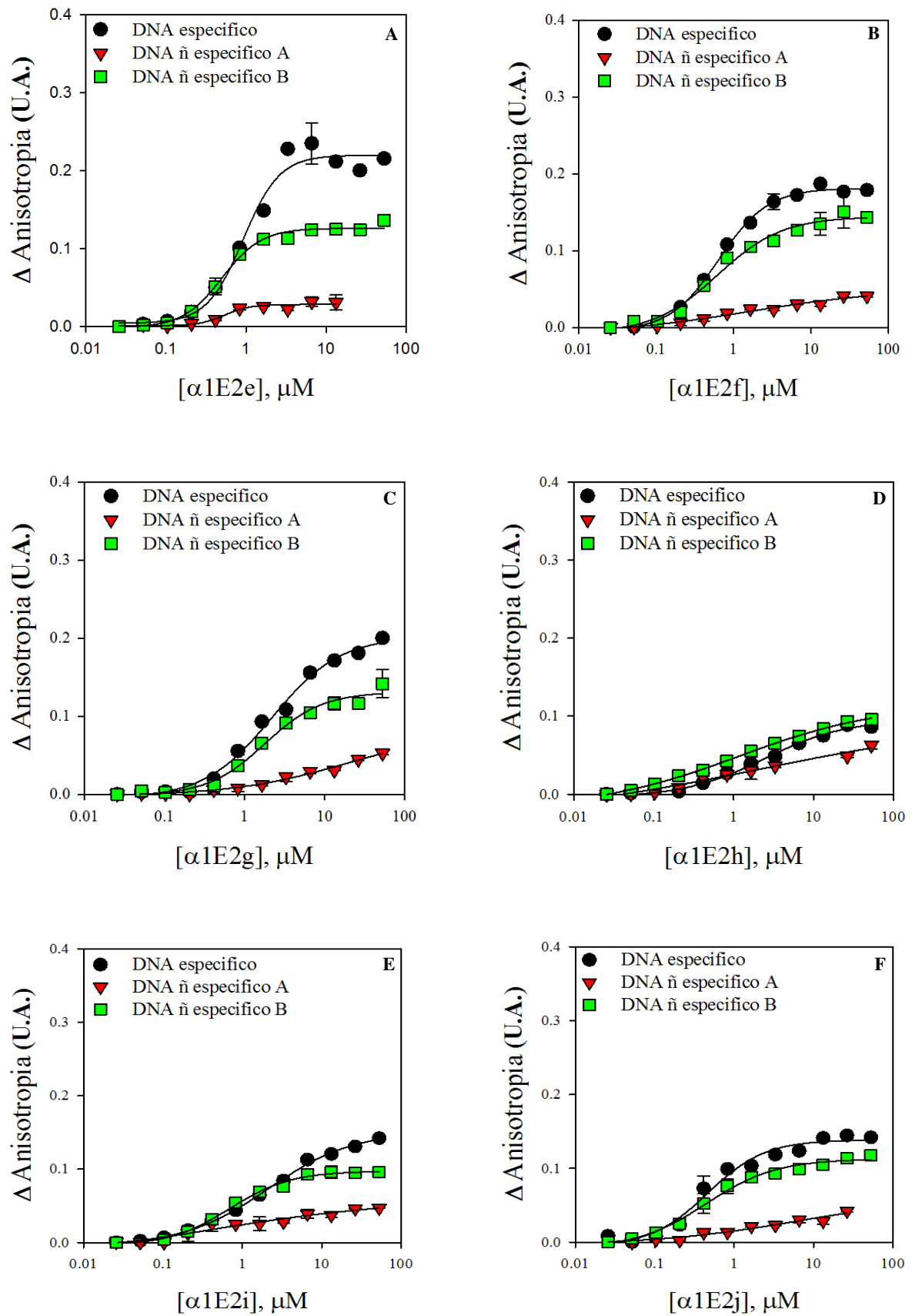


Figura 47. Afinidade de  $\alpha 1E2a$  a  $\alpha 1E2d$  por DNA específico e não específico. DNA não específico A: DNA poli(CG); DNA não específico B: DNA semelhante ao DNA específico com alteração dos nucleotídeos da sequência palíndromo.



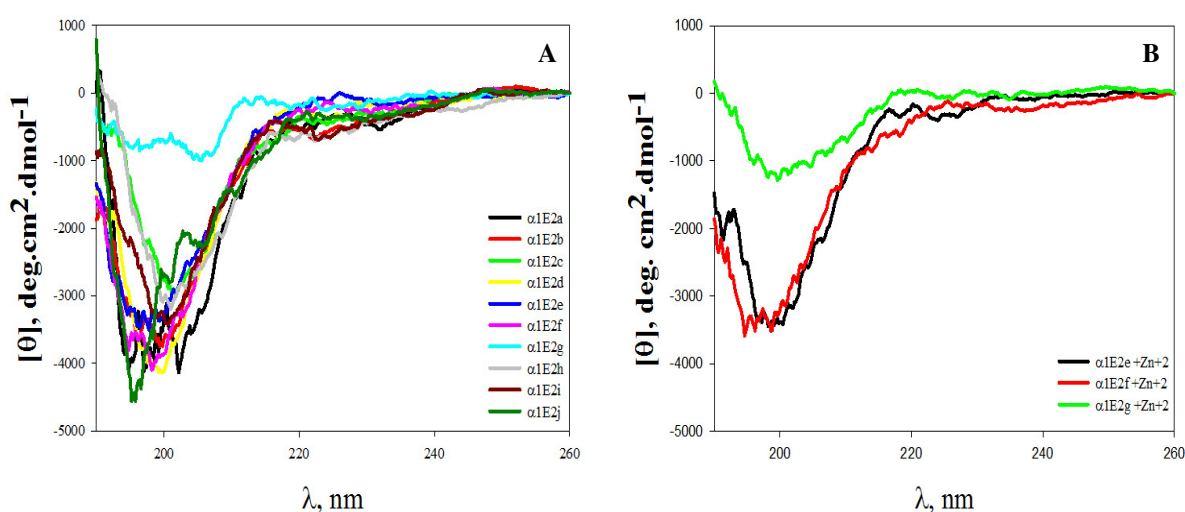
**Figura 48.** Comparação entre a afinidade dos peptídeos  $\alpha$ 1E2e a  $\alpha$ 1E2j por DNA específico e não específico. O DNA ñ específico A representa o DNA poli(CG) e o DNA ñ específico B representa um DNA semelhante ao DNA específico com alteração dos nucleotídeos da sequência palíndromo.

Conforme as Figuras 47 e 48, a afinidade de todos os peptídeos pelo DNA específico foi superior a afinidade por um DNA específico muito diferente do DNA de HPV (DNA não específico A), mostrando a seletividade dos peptídeos pelo DNA de HPV. Entretanto, em relação ao DNA não específico B, que possui semelhança com o DNA específico, a afinidade dos peptídeos  $\alpha 1E2a$ ,  $\alpha 1E2b$ ,  $\alpha 1E2f$ ,  $\alpha 1E2h$ ,  $\alpha 1E2i$  e  $\alpha 1E2j$  foi levemente menor pelo DNA não específico B. Já os peptídeos  $\alpha 1E2c$ ,  $\alpha 1E2d$ ,  $\alpha 1E2e$  e  $\alpha 1E2g$  apresentaram redução de até 50% no valor máximo de anisotropia nas concentrações de platô. Esse resultado poderia indicar que tais peptídeos ligam-se ao DNA não específico B em 1 região apenas da sequência palíndromo, na estequiometria de  $1\text{mol}_{\text{DNA}}:1\text{mol}_{\text{peptídeo}}$ . Havendo, então, a saturação da interação entre eles com uma menor concentração do peptídeo.

#### 4.5 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR DICROÍSMO CIRCULAR

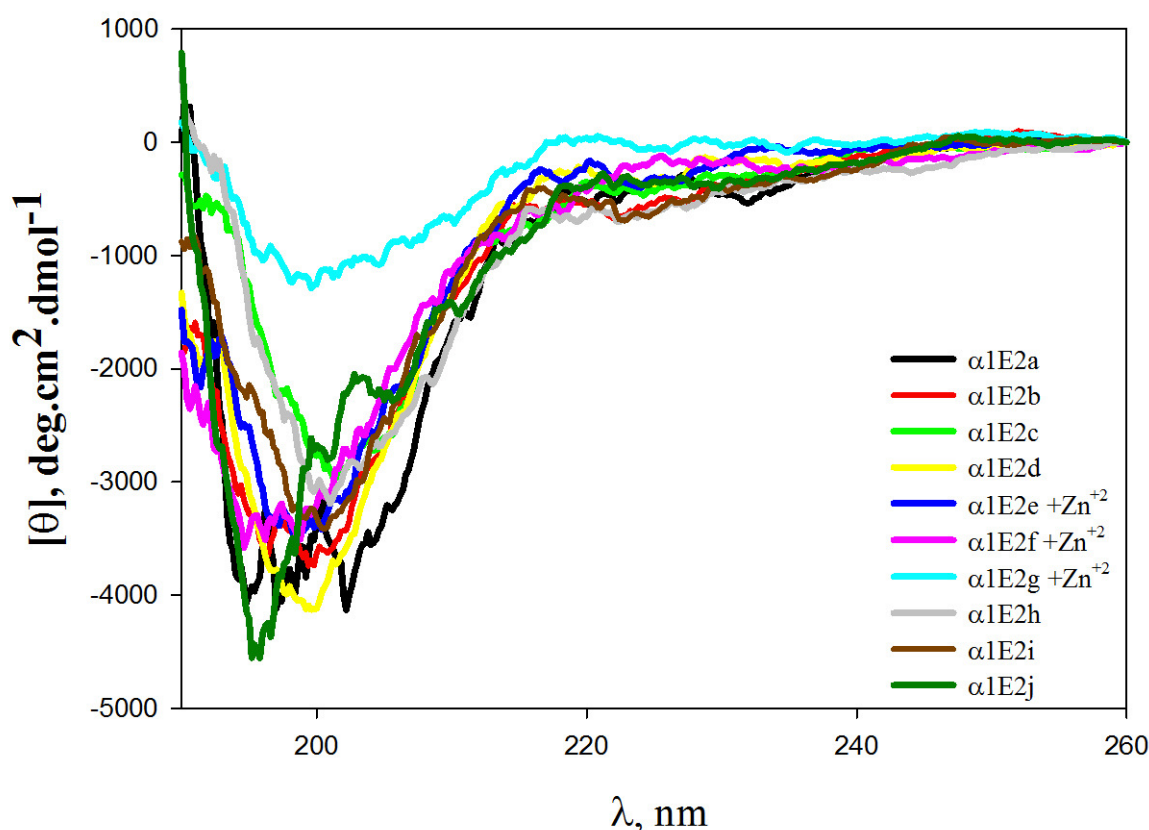
Os dados gerados pelo dicróismo circular dos peptídeos foram processados pelo programa *Spectra Manager* e os gráficos respectivos gerados através do programa *Sigmaplot*, versão 12.0 (Systat Software, San Jose, CA).

A investigação quanto à estrutura secundária dos peptídeos através de CD obteve os resultados mostrados na Figura 49.



**Figura 49. Espectros de CD na região do UV distante dos análogos de  $\alpha 1E2$ .** (A) Espectros de todos os peptídeos em solução tampão Bistris a 10 mM. (B) Espectros dos peptídeos com ligação metálica em solução tampão Bistris a 10 mM com ou sem  $\text{ZnCl}_2$  a 50  $\mu\text{M}$ .

Considerando-se as condições de meio reacional otimizadas para cada peptídeo, de acordo com as suas mutações, os resultados foram agrupados na Figura 50, mostrando apenas a o espectro de CD na condição reacional otimizada de cada peptídeo.



**Figura 50. Espectro de CD na região do UV distante dos análogos de  $\alpha 1E2$  nas condições otimizadas para cada peptídeo.** Os espectros dos peptídeos foram obtidos em solução tampão Bistris a 10 mM com DTT ( $\alpha 1E2a$  e  $\alpha 1E2j$ ), com  $ZnCl_2$  ( $\alpha 1E2e$ ,  $\alpha 1E2f$ ,  $\alpha 1E2g$ ) ou na ausência de DTT e de  $ZnCl_2$  ( $\alpha 1E2b$ ,  $\alpha 1E2c$ ,  $\alpha 1E2d$ ,  $\alpha 1E2h$  e  $\alpha 1E2i$ ).

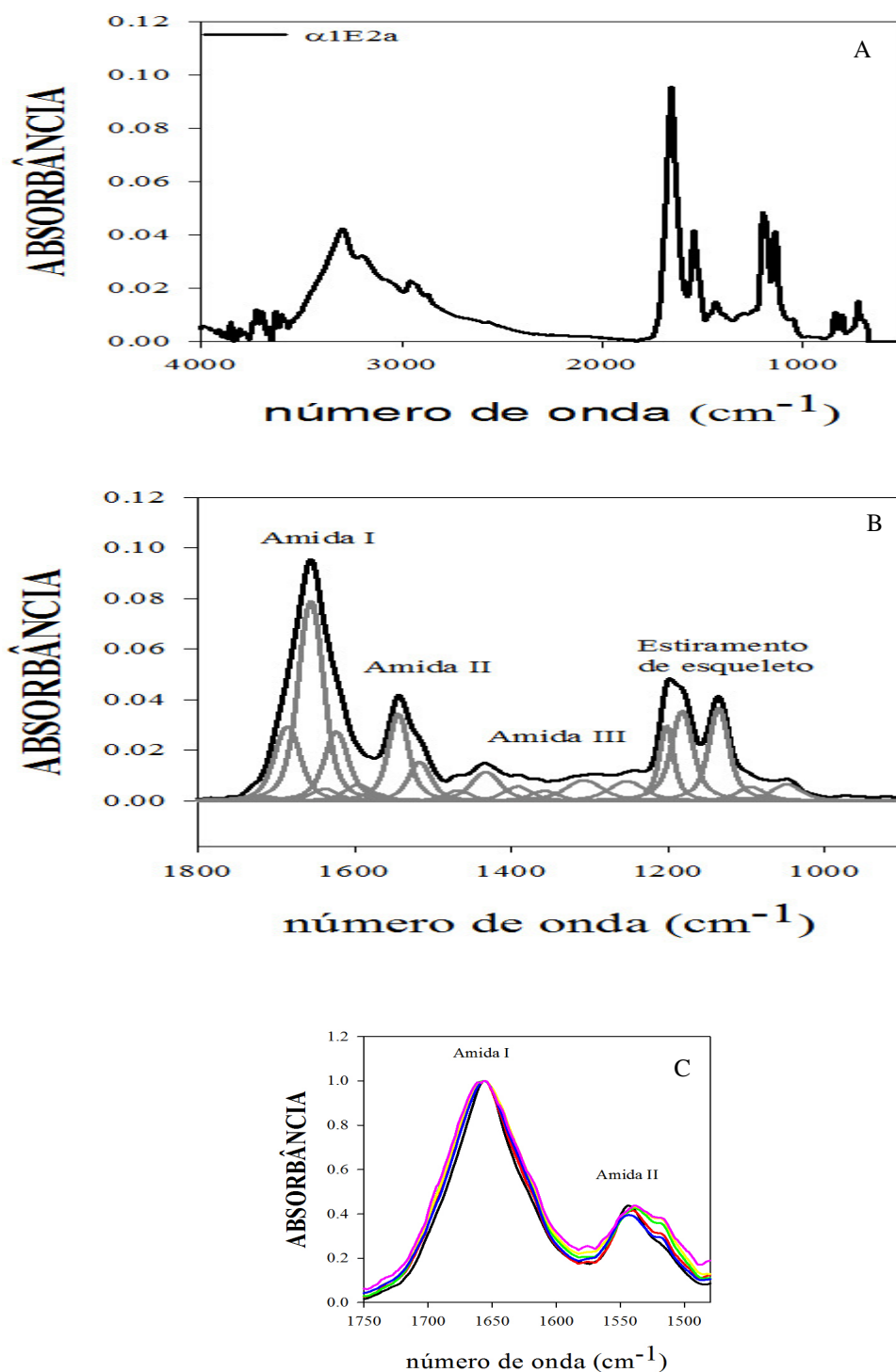
Os espectros de CD obtidos para todos os peptídeos, tanto na ausência de  $Zn^{+2}$ , quanto na presença desse íon (para os peptídeos com ligação metálica entre Histidinas) apresentaram perfis compatíveis com estruturas desordenadas, com valores negativos a  $\sim 190nm$  e pequenos valores de elipticidade molar acima de  $220nm$ . Há uma variação dos espectros entre os peptídeos, sugerindo que eles tenham conteúdos de estruturas secundárias distintos. Porém, ainda se mostrando no geral como peptídeos sem estrutura secundária definida. Como a técnica de Dicroísmo Circular pode sofrer influencia de diversos fatores, a deconvolução dos espectros para quantificar o conteúdo de cada estrutura secundária dos peptídeos não foi considerado.

A região correspondente a  $\alpha 1E2$  na proteína E2-TA apresenta-se como uma  $\alpha$ -hélice, de acordo com estruturas cristalográficas (KIM, S.-S. *et al.*, 2000). Apenas o peptídeo  $\alpha 1E2$

em solução aquosa não possui estrutura secundária definida (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006). A estrutura secundária desorganizada, ou randômica, é um conjunto de conformações irregulares. Enquanto que a  $\alpha$ -hélice corresponde a uma estrutura com alta simetria e organização. Uma estrutura desorganizada é mais favorável entropicamente, por apresentar conformações de menor energia. A mudança conformacional de randômica para  $\alpha$ -hélice envolve a quebra de ligações entre o peptídeo e o solvente, para serem formadas ligações de hidrogênio intramoleculares que estabilizam a  $\alpha$ -hélice. Tal mudança necessita de energia para ocorrer (VAN HOLD; JOHNSON; HO, 1998). De acordo com os ensaios de CD, os peptídeos apresentados no trabalho atual mostraram estrutura secundária desorganizada, assim como  $\alpha$ 1E2a (*wt*), em concordância com a literatura (FABER-BARATA; MOHANA-BORGES; LIMA, 2006). Sugerindo que as mutações propostas à sequência primária de  $\alpha$ 1E2 não geraram aumento da sua organização espacial (Figuras 49 e 50).

## 4.6 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DOS PEPTÍDEOS POR FTIR

As amostras liofilizadas de cada peptídeo foram investigadas por FTIR, obtendo-se os resultados mostrados na figura 46.



**Figura 51. Espectros de Infravermelho (FTIR) de  $\alpha 1E2$ .** (A) Espectro de IR da região de 4000-900  $\text{cm}^{-1}$  do peptídeo  $\alpha 1E2a$ . (B) Espectro da região de 1800-900  $\text{cm}^{-1}$  de  $\alpha 1E2a$ , mostrando os picos das AMIDAS I, II e III, além da deconvolução obtida para essa região. (C) Região das Amidas I e II de todos os peptídeos, normalizada.

Na Figura 51, o quadro (A) mostra o espectro de FTIR total do peptídeo  $\alpha$ 1E2a, de 4000 a 900  $\text{cm}^{-1}$ , como exemplo dos espectros obtidos para todos os demais peptídeos. No quadro (B), vê-se a região de 1800 a 900  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de  $\alpha$ 1E2a, com a respectiva deconvolução dos picos desse intervalo, incluindo das Amidas I, II e III. Em (C) vê-se os picos das Amidas I e II de todos os peptídeos, mostrando a semelhança entre eles. As variações leves da região da Amida I podem indicar as diferenças no conteúdo de estruturas secundárias de cada peptídeo.

A deconvolução dos espectros de cada peptídeo, tendo-se como referência a Tabela 8, originou a Tabela 14, listando a porcentagem dos componentes de estrutura secundária dos peptídeos por FTIR.



Tabela 14. Conteúdo de estrutura secundária dos análogos de  $\alpha$ 1E2 por FTIR

PEPTÍDEO	ESTRUTURA SECUNDÁRIA - FTIR (%)					
	folha $\beta$			Total folha $\beta$	$\alpha$ -hélice / estrutura desordenada	voltas (turns)
	1615cm <sup>-1</sup> (1615 – 1620)	1633cm <sup>-1</sup> (1623 - 1641)	1684cm <sup>-1</sup> (1672 – 1695)		1654 cm <sup>-1</sup> (1648 – 1657)	1672cm <sup>-1</sup> (1662 – 1686)
<b><math>\alpha</math>1E2a</b>	20% (1623cm <sup>-1</sup> )	4% (1638cm <sup>-1</sup> )	21% (1686cm <sup>-1</sup> )	<b>45%</b>	<b>55%</b> (1656cm <sup>-1</sup> )	-----
<b><math>\alpha</math>1E2b</b>	9% (1617cm <sup>-1</sup> )	18% (1633cm <sup>-1</sup> )	8% (1694cm <sup>-1</sup> )	<b>35%</b>	<b>43%</b> (1655cm <sup>-1</sup> )	<b>20%</b> (1675cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2c</b>	13% (1616cm <sup>-1</sup> )	4% (1633cm <sup>-1</sup> )	11% (1694cm <sup>-1</sup> )	<b>28%</b>	<b>66%</b> (1658cm <sup>-1</sup> )	<b>5%</b> (1676cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2d</b>	15% (1620cm <sup>-1</sup> )	17% (1640cm <sup>-1</sup> )	12% (1694cm <sup>-1</sup> )	<b>44%</b>	<b>41%</b> (1657cm <sup>-1</sup> )	<b>15%</b> (1674cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2e</b>	14% (1622cm <sup>-1</sup> )	5% (1631cm <sup>-1</sup> )	8% (1690cm <sup>-1</sup> )	<b>27%</b>	<b>73%</b> (1658cm <sup>-1</sup> )	-----
<b><math>\alpha</math>1E2e + Zn<sup>+2</sup></b>	-----	35% (1622cm <sup>-1</sup> )	4% (1699cm <sup>-1</sup> )	<b>39%</b>	<b>50%</b> (1655cm <sup>-1</sup> )	<b>4%</b> (1683cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2f</b>	10% (1618cm <sup>-1</sup> )	17% (1633cm <sup>-1</sup> )	9% (1695cm <sup>-1</sup> )	<b>36%</b>	<b>46%</b> (1656cm <sup>-1</sup> )	<b>18%</b> (1677cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2f + Zn<sup>+2</sup></b>	35% (1611cm <sup>-1</sup> )	25% (1638cm <sup>-1</sup> )	15% (1690cm <sup>-1</sup> )	<b>75%</b>	-----	<b>26%</b> (1662cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2g</b>	10% (1617cm <sup>-1</sup> )	17% (1633cm <sup>-1</sup> )	14% (1693cm <sup>-1</sup> )	<b>41%</b>	<b>35%</b> (1653cm <sup>-1</sup> )	<b>23%</b> (1671cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2g + Zn<sup>+2</sup></b>	21% (1617cm <sup>-1</sup> )	23% (1640cm <sup>-1</sup> )	26% (1691cm <sup>-1</sup> )	<b>70%</b>	-----	<b>31%</b> (1665cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2h</b>	9% (1618cm <sup>-1</sup> )	23% (1635cm <sup>-1</sup> )	6% (1696cm <sup>-1</sup> )	<b>38%</b>	<b>42%</b> (1655cm <sup>-1</sup> )	<b>20%</b> (1676cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2i</b>	11% (1619cm <sup>-1</sup> )	14% (1632cm <sup>-1</sup> )	12% (1691cm <sup>-1</sup> )	<b>37%</b>	<b>46%</b> (1654cm <sup>-1</sup> )	<b>17%</b> (1671cm <sup>-1</sup> )
<b><math>\alpha</math>1E2j</b>	10% (1618cm <sup>-1</sup> )	23% (1636cm <sup>-1</sup> )	10% (1694cm <sup>-1</sup> )	<b>43%</b>	<b>35%</b> (1655cm <sup>-1</sup> )	<b>22%</b> (1674cm <sup>-1</sup> )

Os resultados dos ensaios de afinidade e estrutura secundária em fase sólida e em solução aquosa dos peptídeos foram, então, organizados na Tabela 15, mostrando as constantes de dissociação, porcentagem de conteúdo de estruturas secundárias por FTIR e por CD, considerando-se as condições otimizadas de meio reacional de acordo com as mutações dos peptídeos. São grifados em **negrito** as  $K_d$  com diferenças significativas, de acordo com o teste estatístico realizado e as porcentagens de estruturas secundárias superiores às encontradas para  $\alpha$ 1E2a.

**Tabela 15. Afinidade e conteúdo de estruturas secundarias dos mutantes de  $\alpha$ 1E2 por diversas técnicas.**

$\alpha$ 1E2	Tampão Bistris	$K_d$ ( $\mu$ M)					Estrutura Secundária			
		s/NaCl	NaCl 5mM	NaCl 10m M	NaCl 25mM	NaCl 50 mM	folhas $\beta$	$\alpha$ -hélice/ estrutura randômica	voltas (turns)	CD
<i>a</i>	+ DTT	0,66 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,11	1,34 $\pm$ 0,22	2,53 $\pm$ 0,32	45%	55%	-----	estrutura randômica
<i>b</i>	_____	0,90 $\pm$ 0,11	0,96 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,12	1,67 $\pm$ 0,35	<b>0,67 <math>\pm</math> 0,24*</b>	35%	43%	20 %	estrutura randômica
<i>c</i>	_____	0,68 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,28	0,69 $\pm$ 0,06	1,87 $\pm$ 0,40	28%	<b>66%</b>	5 %	estrutura randômica
<i>d</i>	_____	0,39 $\pm$ 0,08	<b>1,20 <math>\pm</math> 0,11*</b>	0,69 $\pm$ 0,25	1,13 $\pm$ 0,49	2,64 $\pm$ 0,36	44%	41%	15 %	estrutura randômica
<i>e</i>	+ ZnCl <sub>2</sub>	<b>1,40 <math>\pm</math> 0,15*</b>	1,04 $\pm$ 0,16	0,92 $\pm$ 0,12	1,84 $\pm$ 0,28	<b>0,97 <math>\pm</math> 0,12*</b>	39%	50%	4%	estrutura randômica
<i>f</i>	+ ZnCl <sub>2</sub>	1,09 $\pm$ 0,14	0,77 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,04	1,57 $\pm$ 0,23	2,68 $\pm$ 0,78	<b>75%</b>	-----	26%	estrutura randômica
<i>g</i>	+ ZnCl <sub>2</sub>	<b>3,13 <math>\pm</math> 0,37*</b>	<b>2,69 <math>\pm</math> 0,14*</b>	<b>2,21 <math>\pm</math> 0,31*</b>	<b>3,52 <math>\pm</math> 0,38*</b>	<b>7,28 <math>\pm</math> 0,89*</b>	<b>70%</b>	-----	31%	estrutura randômica
<i>h</i>	_____	0,88 $\pm$ 0,08	1,46 $\pm$ 0,22	<b>2,24 <math>\pm</math> 0,34*</b>	<b>12,02 <math>\pm</math> 2,29*</b>	> 50 $\mu$ M*	38%	42%	20 %	estrutura randômica
<i>i</i>	_____	0,87 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,08	<b>2,13 <math>\pm</math> 0,21*</b>	12,62 $\pm$ 6,10	> 50 $\mu$ M*	37%	46%	17 %	estrutura randômica
<i>j</i>	+ DTT	0,35 $\pm$ 0,05	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,04*</b>	0,45 $\pm$ 0,08	0,88 $\pm$ 0,20	> 50 $\mu$ M*	43%	35%	22 %	estrutura randômica

Os peptídeos  **$\alpha$ 1E2c** e  **$\alpha$ 1E2e** em meio reacional sem  $Zn^{+2}$  apresentaram diminuição na porcentagem de folhas  $\beta$  e voltas (*turns*), com aumento na porcentagem de  $\alpha$ -hélice ou estrutura randômica na estrutura secundária desses peptídeos pela deconvolução dos seus respectivos espectros de IR. A componente em torno de  $1654\text{ cm}^{-1}$  é assinalada por diferentes literaturas como estruturas em a-hélice ou desordenadas. A diferenciação entre essas duas estruturas por FTIR é difícil, podendo gerar interpretações dúbias. Considerando essa componente como estruturas em a-hélice, seria um ganho considerável de conteúdo de estrutura secundária para tais peptídeos. Porém, o espectro de CD mostra perfil de estrutura randômica para todos os peptídeos no ensaio em solução aquosa. Por se tratarem de peptídeos de 16 resíduos de aminoácidos, tais substâncias podem compreender peptídeos intrinsecamente desenovelados, cujas estruturas secundárias oscilam significativamente pelo alto grau de liberdade do peptídeo. Esse tipo de estrutura secundária é comumente encontrado em peptídeos sinalizadores, reguladores, que podem interagir com um ou mais ligantes, de acordo com as condições do meio, favorecendo a adoção de uma conformação com maior afinidade por um ligante ou outro.

Os peptídeos  **$\alpha$ 1E2f** e  **$\alpha$ 1E2g** apresentaram aumento de conteúdo de estruturas em folhas  $\beta$  e voltas, com diminuição do conteúdo de  $\alpha$ -hélice ou estrutura randômica quando em solução contendo  $Zn^{+2}$ . Já o peptídeo  **$\alpha$ 1E2e** a apresentou aumento de conteúdo de estruturas em folhas  $\beta$  quando em solução tampão sem  $Zn^{+2}$ .

Os resultados dos ensaios de estrutura secundária em fase sólida (FTIR) e em solução aquosa (CD) dos peptídeos nas condições otimizadas de meio reacional (tabela 15) mostraram que, apesar do aumento de componentes em  $\alpha$ -hélice e/ou random coil dos peptídeos  **$\alpha$ 1E2c** e  **$\alpha$ 1E2e** em fase sólida, todos os peptídeos apresentaram resultados compatíveis com estrutura randômica. Assim, as otimizações propostas para o peptídeo original  $\alpha$ 1E2a através das mutações apresentadas pelos peptídeos análogos  **$\alpha$ 1E2b** a  **$\alpha$ 1E2j** não ocasionaram estabilização da estrutura secundária do peptídeo em  $\alpha$ -hélice. Apesar disso, os peptídeos  **$\alpha$ 1E2b** e  **$\alpha$ 1E2e** apresentaram aumento de afinidade em relação ao peptídeo  $\alpha$ 1E2a frente ao DNA de HPV na condição de maior força iônica de meio reacional. Sugerindo que a estabilização da estrutura secundária do peptídeo em a-hélice na ausência do seu DNA consenso não seja imprescindível para se aumentar sua interação com tal DNA.

## 5 DISCUSSÃO

Nos ensaios de afinidade dos peptídeos pelo DNA de HPV18, nas forças iônicas do meio reacional testadas, basicamente todos os peptídeos apresentaram afinidade semelhante ou menor que  $\alpha 1E2a$  pelo DNA de HPV, exceto  $\alpha 1E2b$  (mutação da Cys<sub>301</sub> por Ser<sub>301</sub>) e  $\alpha 1E2e$  (ligação metálica entre His<sub>299</sub>-His<sub>302</sub>, além da mutação da Cys<sub>301</sub> por Ser<sub>301</sub>) que apresentaram aumento de afinidade por tal DNA. (Figura 40).

As curvas de afinidade dos peptídeos frente aos DNAs específico e não específicos mostraram que os peptídeos conseguem distinguir entre um DNA de HPV e um DNA muito diferente desse (DNA específico x DNA não específico A). A seletividade dos peptídeos, no entanto, não se mostrou tão grande quando se utilizou um DNA semelhante ao DNA de HPV, com alteração nos pares de nucleotídeos da sequência palíndromo de reconhecimento pela proteína E2. Houve uma diminuição de até ~50% no valor máximo de anisotropia (platô da curva de afinidade), como visto nas Figuras 47 e 48. Supõe-se que os peptídeos conseguiram ligar-se ao DNA não específico B, apesar da alteração dos nucleotídeos da sequência de reconhecimento. Os aminoácidos Asparagina<sub>295</sub> e Glutamina<sub>297</sub> interagem com os nucleotídeos Adenina (A) e Citosina (C) na sequência -ACCG- do DNA específico, mas o DNA não específico B ainda possui uma sequência -AC-, considerando-se a Adenina anterior à sequência palíndromo. Outra explicação para a afinidade dos peptídeos pelo DNA não específico seria que a alteração da sequência -ACCG- por -CAGC- faria com que os aminoácidos mencionados acima interagissem com a Citosina ao invés da Adenina, e vice versa; visto ambos os nucleotídeos poderem fazer uma ligação de hidrogênio via átomo de nitrogênio (Citosina) ou de oxigênio (Adenina) com tais aminoácidos. Talvez os peptídeos possam ligar-se a sequências menores que a hemisequência -ACCG- do DNA de HPV.

Os peptídeos  $\alpha 1E2f$  e  $\alpha 1E2g$ , na presença de Zn<sup>+2</sup>, apresentaram 75 e 70% de conteúdo de estruturas em folhas  $\beta$ , respectivamente. Entretanto, os “grampos” propostos na estrutura primária de  $\alpha 1E2a$  através das mutações desenvolvidas foram idealizados para estabilizarem a estrutura secundária dos peptídeos mutantes em  $\alpha$ -hélice e não em folha  $\beta$ . Já que o peptídeo original liga-se ao DNA de HPV na forma de  $\alpha$ -hélice.

## 6 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos 9 peptídeos análogos a  $\alpha 1E2$  de HPV18 e investigadas suas afinidade e especificidade em relação a DNA de HPV.

Com base nos experimentos realizados, na maior condição de força iônica testada, 50mM de NaCl, os peptídeos  **$\alpha 1E2b$**  (mutação da Cys<sub>301</sub> por Ser<sub>301</sub>) e  **$\alpha 1E2e$**  (ligação metálica entre His<sub>299</sub>-His<sub>302</sub>, além da mutação da Cys<sub>301</sub> por Ser<sub>301</sub>) apresentaram aumento de afinidade por DNA de HPV em relação a  $\alpha 1E2a$ .

Todos os peptídeos apresentaram seletividade por DNA de HPV, discriminando-o de um DNA diferente do DNA de HPV, porém apresentando afinidade reduzida por um DNA semelhante ao DNA de HPV, mas com a sequência palíndromo de reconhecimento ACCG-N<sub>4</sub>-CGGT alterada.

Os análogos de  $\alpha 1E2$  desenvolvidos apresentaram tanto por investigação em fase sólida (FTIR) quanto em solução (CD) estrutura secundária randômica.

A inserção de ligações dissulfeto e/ou ligações metálicas à sequência original de  $\alpha 1E2$  não ocasionou a estabilização da estrutura secundária do peptídeo  $\alpha 1E2$  em  $\alpha$ -hélice. Apesar disso, houve aumento de conteúdo de estruturas secundárias pelas mutações propostas nos peptídeos  $\alpha 1E2c$ ,  $\alpha 1E2f$  e  $\alpha 1E2g$ , de acordo com os experimentos em solução aquosa (FTIR). Tendo em vista o aumento de afinidade dos peptídeos  $\alpha 1E2b$  e  $\alpha 1E2e$ , ainda que apresentando estrutura secundária randômica, a estabilização do peptídeo em  $\alpha$ -hélice pode não ser crucial para sua interação com seu DNA consenso e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de análogos com maior afinidade por tal DNA.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTSON, A. A. *et al.* Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature*, v. 403, n. 6771, p. 805–809, 17 fev. 2000. Acesso em: 21 mar. 2013.

BAKER, T. S. *et al.* Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal*, PMID: 1663794PMCID: PMC1260204, v. 60, n. 6, p. 1445–1456, dez. 1991. Acesso em: 20 mar. 2013.

BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 35, n. 4, p. 369–430, nov. 2002. Acesso em: 5 jun. 2013.

BELL, M. C.; ALVAREZ, R. D. Chemoprevention and vaccines: a review of the nonsurgical options for the treatment of cervical dysplasia. *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 15, n. 1, p. 4–12, 2005. Acesso em: 26 mar. 2013.

BOCH, J. *et al.* Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, v. 326, n. 5959, p. 1509–1512, 29 out. 2009. Acesso em: 19 mar. 2013.

CARLSON, D. F.; FAHRENKRUG, S. C.; HACKETT, P. B. Targeting DNA With Fingers and TALENs. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*, v. 1, n. 1, p. e3, jan. 2012. Acesso em: 19 mar. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *CDC - Condom Effectiveness - Male Latex Condoms and Sexually Transmitted Diseases*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/condomeffectiveness/latex.htm>>. Acesso em: 23 mar. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *CDC - HPV-Associated Cancers Statistics*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/>>. Acesso em: 23 mar. 2013.

CHIANG, C.-M. *et al.* Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 13, p. 5799–5803, 1992. Acesso em: 19 mar. 2013.

CLARK, K. J.; VOYTAS, D. F.; EKKER, S. C. A TALE of Two Nucleases: Gene Targeting for the Masses? *Zebrafish*, v. 8, n. 3, p. 147–149, set. 2011. Acesso em: 19 mar. 2013.

COUTINHO, L. F. P. *et al.* Autoria: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia Sociedade Brasileira de Cancerologia. 2011. Disponível em: <[http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/cancer\\_do\\_colo\\_uterino-tratamento.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/cancer_do_colo_uterino-tratamento.pdf)>. Acesso em: 19 mar. 2013.

D'ABRAMO, C. .; ARCHAMBAULT, J. Small Molecule Inhibitors of Human Papillomavirus Protein - Protein Interactions. *The Open Virology Journal*, PMID: 21769307PMCID: PMC3137155, v. 5, p. 80–95, 4 jul. 2011. Acesso em: 28 nov. 2013.

DE SANJOSE, S. *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, nov. 2010. Acesso em: 23 mar. 2013.

DOYLE, E. L. *et al.* TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. W1, p. W117–W122, 12 jun. 2012. Acesso em: 19 mar. 2013.

FABER-BARATA, J.; MOHANA-BORGES, R.; LIMA, L. M. T. R. Specificity in DNA recognition by a peptide from papillomavirus E2 protein. *FEBS Letters*, v. 580, n. 8, p. 1919–1924, abr. 2006. Acesso em: 19 mar. 2013.

GIESEL, G. M. *et al.* Characterization of the papillomavirus  $\alpha$ 1E2 peptide unfolded to folded transition upon DNA binding. *FEBS Letters*, v. 582, n. 25–26, p. 3619–3624, 29 out. 2008. Acesso em: 21 mar. 2013.

GOORMAGHTIGH, E.; RUYSSCHAERT, J.-M.; RAUSSENS, V. Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. *Biophysical Journal*, v. 90, n. 8, p. 2946–2957, 15 abr. 2006. Acesso em: 9 jul. 2013.

GOVERNMENT OF CANADA, H. C. *It's Your Health - Human Papillomavirus (HPV)* [Health Canada, 2010]. publication. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/iyh-vsv/diseases-maladies/hpv-vph-eng.php>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, jan. 2007. Acesso em: 19 mar. 2013.

HEGDE, R. S. THE PAPILOMAVIRUS E2 PROTEINS: Structure, Function, and Biology. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, PMID: 11988474, v. 31, n. 1, p. 343–360, 2002. Acesso em: 21 mar. 2013.

HINES, C. S. *et al.* DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, v. 276, n. 4, p. 809–818, 6 mar. 1998. Acesso em: 21 mar. 2013.

HUBBERT, N. L. *et al.* Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 85, n. 16, p. 5864–5868, 8 jan. 1988. Acesso em: 21 mar. 2013.

INCA. *Câncer de Colo de Útero*. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio](http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio)>. Acesso em: 28 mar. 2013a.

INCA. *Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil*. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em: 28 mar. 2013b.

IUCHI, S.; KULDELL, N. *Zinc finger proteins: from atomic contact to cellular function*. Georgetown, Tex.: New York: Landes Bioscience; Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. (Molecular biology intelligence unit).

KIM, S.-S. *et al.* The Structural Basis of DNA Target Discrimination by Papillomavirus E2 Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 40, p. 31245–31254, 10 jun. 2000. Acesso em: 21 mar. 2013.

KIM, Y. *et al.* Specific Labeling of Zinc Finger Proteins using Noncanonical Amino Acids and Copper-Free Click Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, v. 23, n. 9, p. 1891–1901, 19 set. 2012. Acesso em: 19 mar. 2013.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006. Acesso em: 19 mar. 2013.

LEHTINEN, M. *et al.* Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *The Lancet Oncology*, v. 13, n. 1, p. 89–99, jan. 2012. Acesso em: 26 mar. 2013.

LIMA, L. M. T. R. *INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNA E2c DE PAPILOMAVÍRUS E ADN: UMA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA E TERMODINÂMICA*. 2001. 127 f. UFRJ, 2001.

LIMA, L. M. T. R. Positive Contribution of Hydration on DNA Binding by E2c Protein from Papillomavirus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 46, p. 47968–47974, 30 ago. 2004. Acesso em: 19 mar. 2013.

LUSCOMBE, N. M.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Research*, PMID: 11433033PMCID: PMC55782, v. 29, n. 13, p. 2860–2874, 1 jul. 2001. Acesso em: 21 mar. 2013.

MA, S. *et al.* Highly Efficient and Specific Genome Editing in Silkworm Using Custom TALENs. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, p. e45035, 18 set. 2012. Acesso em: 19 mar. 2013.

MAHDAVI, A.; MONK, B. J. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *The Oncologist*, v. 10, n. 7, p. 528–538, 2005. Acesso em: 19 mar. 2013.

Mc BRIDE, A. A.; MYERS, G. The E2 protein. Disponível em: <[http://www.stdgen.lanl.gov/COMPENDIUM\\_PDF/97PDF/3/E2.pdf](http://www.stdgen.lanl.gov/COMPENDIUM_PDF/97PDF/3/E2.pdf)>. Acessado em: 19/07/2011.

MINO, T. *et al.* Inhibition of human papillomavirus replication by using artificial zinc-finger nucleases. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 52, n. 1, p. 185–186, 1 set. 2008. Acesso em: 19 mar. 2013.

MORRISON, K. L.; WEISS, G. A. Combinatorial alanine-scanning. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, p. 302 – 307, 2001. Acesso em: 31 mar. 2013.

MULÉ, G. DOS S. *Reconhecimento nucléico por domínios peptídicos mínimos planejados a partir de receptores nucleares*. Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.



PANG, C. L.; THIERRY, F. Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microbial Pathogenesis*, nov. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401012001945>>. Acesso em: 19 mar. 2013.

SEEMAN, N. C.; ROSENBERG, J. M.; RICH, A. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Biophysics*, v. 73, n. 3, p. 804–808, 1976. Acesso em: 30 mar. 2013.

SERA, T. Inhibition of virus DNA replication by artificial zinc finger proteins. *Journal of virology*, v. 79, n. 4, p. 2614–2619, 2005. Acesso em: 19 mar. 2013.

SERA, T.; URANGA, C. Rational Design of Artificial Zinc-Finger Proteins Using a Nondegenerate Recognition Code Table. *Biochemistry*, v. 41, n. 22, p. 7074–7081, jun. 2002. Acesso em: 19 mar. 2013.

VAN HOLD, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. *Principles of Physical Biochemistry*. New Jersey: Prentice Hall, 1998. . Acesso em: 28 mar. 2013.

VELDE, N. V. DE *et al.* Population-Level Impact of the Bivalent, Quadrivalent, and Nonavalent Human Papillomavirus Vaccines: A Model-Based Analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 104, n. 22, p. 1712–1723, 21 nov. 2012. Acesso em: 23 mar. 2013.

WHEELER, C. M. *et al.* Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *The Lancet Oncology*, v. 13, n. 1, p. 100–110, jan. 2012. Acesso em: 23 mar. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *New and Under-utilized Vaccines Implementation (NUVI) - Human papillomavirus (HPV)*. Disponível em: <[www.who.int/nuvi/hpv/en/](http://www.who.int/nuvi/hpv/en/)>. Acesso em: 30 mar. 2013.

WU, J.; KANDAVELOU, K.; CHANDRASEGARAN, S. Custom-designed zinc finger nucleases: What is next? *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64, n. 22, p. 2933–2944, 4 set. 2007. Acesso em: 19 mar. 2013.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 5, p. 342–350, maio 2002. Acesso em: 28 nov. 2013.