



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



Roteiro de aula prática – Módulo II – 10/05/2024

RCB0300 – Tópicos em Biotecnologia III

Nome: _____ N° USP: _____

Objetivo: Análise da Imunogenicidade das respectivas moléculas de mRNA por meio do banco IEDB.

Metas de aprendizagem para a terceira aula prática sobre vacina de mRNA contra SARS-CoV-2:

Conforme descrito no Capítulo 5 do Livro de Imunologia Celular e Molecular Abbas et al 2019 - 9ª Edição:

Por definição, um epítopo é qualquer substância que pode ser especificamente ligada por uma molécula de anticorpo ou receptor de célula T. Nem todos os antígenos reconhecidos por linfócitos específicos ou por anticorpos secretados são capazes de ativar linfócitos. Epítopo é sinônimo de determinante, isto é, a porção da macromolécula que o anticorpo se liga.

O reconhecimento dos antígenos pelos anticorpos envolve ligação não covalente e reversível. Vários tipos de interações não covalentes podem contribuir para a ligação do anticorpo aos antígenos incluindo forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas. A força de ligação entre um único anticorpo e um epítopo é denominado afinidade do anticorpo. A afinidade é normalmente representada por uma constante de dissociação (Kd), o qual indica quão fácil é a separação (dissociação) de um complexo antígeno-anticorpo em seus constituintes. Uma Kd menor indica uma interação de afinidade mais forte o maior porque uma menor concentração do antígeno e do anticorpo é necessária para a formação do complexo. A Kd dos anticorpos produzidos em respostas imunes humorais típicas normalmente varia entre 10^{-7} a 10^{-11} M. O soro de um indivíduo.

Nas respostas imunes humorais, os linfócitos B internalizam antígenos proteicos e apresentam peptídeos derivados destas proteínas às células T auxiliares.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



Conforme descrito no Capítulo 6 do Livro de Imunologia Celular e Molecular Abbas et al 2019 - 9ª Edição:

As principais funções dos linfócitos T são erradicar infecções por microorganismos intracelulares e ativar outras células, como macrófagos e linfócitos B. Os linfócitos T reconhecem e respondem aos antígenos células-associadas e não aos antígenos solúveis livres da célula. A tarefa de exibir antígenos associados a uma célula do hospedeiro para serem reconhecidos por células T CD4⁺ ou T CD8⁺ é realizada por proteínas especializadas chamadas **moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)**, as quais são expressas nas superfícies das células do hospedeiro. As moléculas de MHC são altamente polimórficas e as variações nas moléculas do MHC existentes entre indivíduos influenciam tanto a ligação do peptídeo como o reconhecimento pela célula T. Uma única célula T pode reconhecer um peptídeo específico exibido por apenas uma em meio a um amplo número diferente de moléculas do MHC existentes. Esse fenômeno é denominado **restrição do MHC**.

Os peptídeos que se ligam a moléculas do MHC compartilham características estruturais que promovem essa interação. Uma dessas características é o tamanho do peptídeo - as moléculas da classe I podem acomodar peptídeos com 8-11 resíduos de comprimento, enquanto as moléculas de classe II se ligam a peptídeos que podem ter 10-30 resíduos de comprimento, sendo que o comprimento ideal é de 12-16 resíduos.

Com base nessa breve revisão, realize as atividades abaixo descritas.

1. Conhecer a ferramenta <https://web.expasy.org/translate/> da plataforma **Expasy** (*Expert Protein Analysis System*), o qual é um banco de bioinformática mantido pelo Instituto Suíço de Bioinformática que permite converter uma sequência de nucleotídeos em sequência de aminoácidos. Faça a tradução das duas vacinas de mRNA, antes e após a adição das mutações 2P. Observação: tenha certeza de colar apenas a partir do códon de iniciação até o stop códon e selecionar a opção do **Frame 1** 5' a 3'.
2. Coloque a sequência de aminoácidos em um documento do word. Lembre-se: sempre utilize **fonte courier new, tamanho 10 e margens estreitas**. Colorir em **azul a região do domínio RBD (319-537)**, para o vírus SARS-CoV-2 original, e em **vermelho a região das mutações 2P (K e V por duas prolinas)**;



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



3. Conhecer o site IEDB Immune Epitope Database & Tools (<https://www.iedb.org>), o qual contém um catálogo de epítomos de linfócitos B e T estudados em humanos e outras espécies animais no contexto de doenças infecciosas.
4. Conhecer a ferramenta do IEDB que permite realizar a predição de epítomos de anticorpos: <http://tools.iedb.org/bcell/>. Determinar a predição de epítomos da proteína spike codificada por ambas vacinas de mRNA, **antes e após** a adição das mutações missense 2P. Pergunta: há diferença no número de epítomos?;
5. Conhecer a ferramenta do IEDB que permite fazer a predição de epítomos de MHC classe I: <http://tools.iedb.org/mhci/>. Coloque a sequência da proteína Spike e **clique em Select HLA allele reference set** e em seguida clique em **submit**;
6. Você obterá uma tabela com 8 informações sobre cada epítomo. Primeiro considere a informação da última coluna, a qual mostra a afinidade de ligação de cada epítomo a um determinado alelo de MHC-I. Selecione um epítomo com 100% de afinidade e que pertença à região do receptor (RBD) e responda às seguintes perguntas: a) qual o tamanho do epítomo?; b) qual a sequência de aminoácidos?; c) esse epítomo é ligante de qual alelo de MHC-I?
7. Conhecer a ferramenta do IEDB que permite fazer a predição de epítomos de MHC classe II: <http://tools.iedb.org/mhcii/>. Coloque a sequência da proteína Spike e **clique em Select full HLA allele set** e em seguida clique em **submit**;
8. Você obterá uma tabela com 9 informações sobre cada epítomo. Primeiro considere a informação da última coluna, a qual mostra a afinidade de ligação de cada epítomo a um determinado alelo de MHC-II. Selecione um epítomo com 100% de afinidade e que pertença à região do receptor (RBD) e responda às seguintes perguntas: a) qual o tamanho do epítomo?; b) qual a sequência de aminoácidos?; c) esse epítomo é ligante de qual alelo de MHC-II?