



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Pamella Cristiny Carneiro da Silva

**Estudo de Dinâmica Molecular do mecanismo de interação antígeno-anticorpo da
proteína AMA1 do *Plasmodium falciparum***

Campinas

2023

Pamella Cristiny Carneiro da Silva

Estudo de Dinâmica Molecular do mecanismo de interação antígeno-anticorpo da proteína AMA1 do *Plasmodium falciparum*

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Química na área de Físico-química.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Martínez

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Pamella Cristiny Carneiro da Silva e orientada pelo Prof. Dr. Leandro Martínez.

Campinas

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Si38e Silva, Pamella Cristiny Carneiro da, 1993-
Estudo de dinâmica molecular do mecanismo de interação antígeno-anticorpo da proteína AMA1 do *Plasmodium falciparum* / Pamella Cristiny Carneiro da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Leandro Martínez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Dinâmica molecular. 2. Antígeno 1 de membrana apical. 3. Amostragem ampliada. I. Martínez, Leandro, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Molecular dynamics study of the antigen-antibody interaction mechanism of the *Plasmodium falciparum* AMA1 protein

Palavras-chave em inglês:

Molecular dynamics

Apical membrane antigen

Expanded sampling

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestra em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Leandro Martínez [Orientador]

Alessandro Silva Nascimento

Munir Salomão Skaf

Data de defesa: 24-10-2023

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0004-4640-4155>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9760671455866220>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leandro Martínez (Orientador)

Prof. Dr. Munir Salomão Skaf (Universidade Estadual de Campinas)

Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento (Universidade de São Paulo)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna Pamella Cristiny Carneiro da Silva, aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de outubro de 2023.

*A realidade é como um mosaico, as partes
podem ser feias em si, mas o todo é belo.*
J. Edwards

(Dinâmica de proteínas também)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES. Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço ao CCES (*Center for Computing in Engineering and Sciences*) pelo suporte e excelente estrutura para que possamos realizar nossas pesquisas.

Agradeço ao CENAPAD-SP também pela excelente estrutura para que possamos rodar cálculos.

Agradeço ao meu orientador, professor Leandro Martínez, que é uma pessoa sempre disponível, solícita e bem-humorada. O professor Leandro sempre acrescenta críticas construtivas para nosso crescimento e de nossos trabalhos. Obrigada.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por toda ajuda e trocas, em especial, ao Ander e ao Vinícius pela amizade que construímos.

Agradeço a Deus, à minha família e meus amigos. Em especial, meus pais, Francisco e Evani, e meu esposo Ramón. Tenho consciência que só passei por muitos lugares porque outras pessoas acreditavam em mim mais do que eu.

RESUMO

A proteína Antígeno de Membrana Apical 1 (AMA1) do *Plasmodium falciparum* (PfAMA1), é uma proteína de superfície encontrada em mais de uma fase do ciclo de vida da malária. Sabe-se que esta é uma proteína de reorientação no chamado “movimento de junção”, momento em que as membranas do parasita e do hospedeiro estão em contato durante a invasão. A estrutura de um epítipo conformacional do domínio III da PfAMA1 em complexo com o anticorpo monoclonal Fab F8.12.19 é conhecida experimentalmente. Este trabalho utilizou dinâmica molecular com amostragem ampliada por trocas de réplicas hamiltonianas (*Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics* - HREMD) para compreender o efeito de interações intermoleculares, variabilidade conformacional e regiões intrinsecamente desordenadas no mecanismo de interação antígeno-anticorpo. Foram utilizados métodos de clusterização e análises de variabilidade conformacional a fim de compreender a influência da presença ou ausência da proteína parceira no complexo. O epítipo em estado livre acessa um conjunto conformacional mais amplo, incluindo conformações desordenadas não observadas na interação com o anticorpo. As simulações sugerem um mecanismo de seleção conformacional estendida, em que o anticorpo interagiu e estabilizou conformações já existentes do epítipo em estado livre. A estabilização da conformação ativa se dá majoritariamente pelas ligações de Hidrogênio: Tyr(H33)-Asp493, Tyr(H35)-Asp493 e His(L94)-Val510. O anticorpo apresenta uma estrutura bastante rígida e apenas a CDR-H3 demonstrou uma maior plasticidade na presença do epítipo.

ABSTRACT

Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 (*PfAMA1*) is a surface protein found in more than one stage of the malaria life cycle. It is known that this is a reorientation protein in the so-called “junction movement”, the moment when the membranes of the parasite and the host are in contact during the invasion. The structure of a conformational epitope of domain III of *PfAMA1* in complex with the monoclonal antibody Fab F8.12.19 is experimentally known. This work used molecular dynamics with amplified sampling by Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics (HREMD) to understand the effect of intermolecular interactions, conformational variability, and intrinsically disordered regions on the mechanism of antigen-antibody interaction. Clustering methods and the analysis of conformational variability were used in order to understand the influence of the presence or absence of the partner protein in the complex. The free-state epitope accesses a broader conformational pool, including disordered conformations not seen in antibody interactions. The simulations suggest an extended conformational selection mechanism in which the antibody interacted with and stabilized already existing conformations of the epitope in the free state. The stabilization of the active conformation occurs mainly through hydrogen bonds: Tyr(H33)-Asp493, Tyr(H35)-Asp493 and His(L94)-Val510. The antibody has a very rigid structure, and only CDR-H3 showed greater plasticity in the presence of the epitope.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** a) Ciclo de vida do *Plasmodium spp.* Adaptado de (Njoroge et al., 2014) e b) estado hepático latente do parasita.....18
- Figura 1.2** Modelos do arranjo quaternário da *PfAMA1* (a) AlphaFold2:D9MYA2 e (b) AlphaFold2:C5HWE3.....19
- Figura 1.3** AMA1 atuando na reorientação do parasita durante o movimento de junção (Adaptado de (De Niz et al., 2017)).....20
- Figura 1.4** Número de publicações entre 1990 e 2022 utilizando Proteínas Intrinsecamente Desordenadas (IDPs), Dinâmica Molecular e Malária em seu escopo.....22
- Figura 1.5** IDPs disponíveis no MobiDB mais citados na literatura.....23
- Figura 2.1** (a) Interação específica de anticorpos produzidos por células B e (b) Estrutura básica de um anticorpo Ig. Figuras geradas com (Biorender, 2021).....25
- Figura 2.2** Exemplos de epítopos (a) linear e (b) conformacional. A palavra EPITOPO disposta nas sequências indica os aminoácidos que realizam a interação. Em um epítipo linear estes aminoácidos estão dispostos sequencialmente, enquanto no epítipo conformacional, o enovelamento da proteína aproxima e apresenta aminoácidos que estão dispersos e podem estar presentes em regiões alternadas.....26

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.3 Reconhecimento do epítopo de antígenos (parte escura da molécula em vermelho) pelo parótopo de anticorpos Ig (em cinza)..... | 27 |
| Figura 2.4 Representação esquemática de mecanismos de interação intermoleculares (a) chave-fechadura, (b) ajuste induzido e (c) seleção conformacional..... | 30 |
| Figura 3.1 Etapas da simulação de Dinâmica Molecular. Adaptado de (L. Martínez et al., 2007)..... | 38 |
| Figura 3.2 Classificação de métodos de amostragem ampliada baseados no uso de variáveis coletivas. Adaptado de (Harpole & Delemotte, 2018). Onde (F) é o estado fechado ou enovelado, (I) é o intermediário e (A) é o estado aberto ou desenovelado...44 | |
| Figura 3.3 Visão geral da DM utilizando troca de réplicas e escalonando os potenciais..... | 46 |
| Figura 4.1 Estrutura do complexo (PDB id. 2J5L). Epítopo do Domínio III da <i>Pf</i> AMA1 em verde e cadeias do anticorpo em roxo e laranja..... | 47 |
| Figura 4.2 Sistemas submetidos à simulação de Dinâmica Molecular e os parâmetros de escalonamento usados na troca de réplicas hamiltonianas..... | 49 |
| Figura 5.1 Estimativa de desordem obtida pelo servidor DISOPRED3 para a proteína <i>Pf</i> AMA1. Regiões com score maior que 0.5 são consideradas desordenadas..... | 53 |
| Figura 5.2 (a) Densidade de probabilidade do RMSD do epítopo livre (azul claro) e ligado (azul escuro); e densidades de RMSD em função da densidade do RG para o epítopo (b) livre e (c) ligado..... | 55 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5.3 Frações de resíduos alinhados no epítopo (a) livre e (b) ligado e as respectivas contribuições dos subconjuntos estruturais para o epítopo (c) livre e (d) ligado. IDRs em vermelho e região de interação com anticorpo indicada pela seta..... | 57 |
| Figura 5.4 RMSF para o epítopo (a) livre e (b) ligado..... | 57 |
| Figura 5.5 Fator-B do epítopo na estrutura cristalográfica PDB id. 2J5L..... | 58 |
| Figura 5.6 Histograma do RMSD da região Lys489-Pro494 do epítopo que realiza interação direta com o anticorpo. Em azul está apresentado o RMSD do epítopo em complexo e, em vermelho, o do epítopo livre..... | 59 |
| Figura 5.7 Diferença dos RMSDs da região de α -hélice dos estados ligado e livre em relação a estrutura cristalográfica..... | 60 |
| Figura 5.8 Distância entre as estruturas secundárias em (a) folhas- β e (b) gráfico das distâncias ao longo da trajetória nos estados livre (rosa) e ligado (roxo)..... | 60 |
| Figura 5.9 (a) Distância assumida entre átomos das estruturas secundárias em folha- β e α -hélice e concentração dessas distâncias no epítopo (b) livre e (c) ligado..... | 62 |
| Figura 5.10 Clusterização das estruturas obtidas na trajetória do epítopo livre por (a) dendrograma e (b) quantidade de estruturas por cluster..... | 64 |
| Figura 5.11 Alinhamento das estruturas base dos quatro grupos de clusters para o epítopo livre..... | 64 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5.12 RMSDs das estruturas bases dos clusters em relação à estrutura cristalográfica..... | 65 |
| Figura 5.13 Clusterização das estruturas obtidas na trajetória do epítipo ligado por (a) dendrograma e (b) quantidade de estruturas por clusters..... | 66 |
| Figura 5.14 Alinhamento das estruturas base dos seis grupos de clusters do epítipo ligado..... | 66 |
| Figura 5.15 Densidade de RMSD em função da densidade de Srel nos estados (a) livre e (b) ligado..... | 68 |
| Figura 5.16 Srel obtidos nos estados (a) livre e (b) ligado..... | 69 |
| Figura 5.17 Regiões Determinantes de Complementariedade anticorpo Fab F8.12.19 de cadeia pesada (H1, H2 e H3) e cadeia leve (L1, L2 e L3). O epítipo está representado em magenta..... | 70 |
| Figura 5.18 Percentual de conformações das simulações em que ligações de Hidrogênio entre o epítipo e as CDRs são observadas. H1 em vermelho, H2 em ciano, H3 em laranja e L3 em azul..... | 72 |
| Figura 5.19 Quantidade de ligações de Hidrogênio realizadas pelas CDRs de (a) cadeia pesada e de (b) cadeia leve em cada frame..... | 73 |
| Figura 5.20 Regiões pouco flexíveis no parótopo do anticorpo em azul segundo classificação do <i>software</i> MDLovoFit..... | 74 |
| Figura 5.21 Gráficos de RMSF das cadeias (a) leve e (b) pesada do anticorpo livre em azul claro e ligado em laranja..... | 75 |

Figura 5.22 (a) Diferenças dos maiores RMSDs entre os estados livre e ligado nas CDRs do anticorpo Fab F8.12.19 e (b) densidade dos RMSDs nos dois estados da CDR-H3.....76

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 2.1 Estruturas dos complexos antígeno-anticorpo disponíveis no PDB..... | 31 |
| Tabela 5.2 Interações polares antígeno-anticorpo no complexo PfAMA1 e Fab F8.12.19..... | 71 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| AMA1 | Antígeno de Membrana Apical 1 |
| CDR | <i>Complementarity Determining Regions</i> ou regiões determinantes de complementaridade |
| CHARMM36 | <i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics 36</i> |
| DM | Dinâmica Molecular |
| DTN | Doenças Tropicais Negligenciadas |
| Fab | <i>Fragment antigen-binding</i> |
| Fv | <i>Fragment variable</i> |
| HCA | <i>Hierarchical Clustering Analysis</i> |
| HREMD | <i>Hamiltonian replica exchange molecular dynamics</i> |
| IDP | <i>Intrinsically Disordered Proteins</i> |
| IDR | <i>Intrinsically Disordered Regions</i> |
| IPP | Interações Proteína-Proteína |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| <i>Pf</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| RG | Raio de Giro |
| RMSD | <i>Root Mean Square Deviation</i> |
| RMSF | <i>Root Mean Square Fluctuation</i> |
| SASA | <i>Solvent Accessible Surface Area</i> |
| Srel | SASA relativa |
| VC | Variáveis Coletivas |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. PROTEÍNA ANTÍGENO DE MEMBRANA APICAL 1 (PfAMA1)..... | 17 |
| 1.1 CICLO DE VIDA DA MALÁRIA..... | 17 |
| 1.2 PfAMA1: CARACTERÍSTICAS E FUNÇÃO..... | 18 |
| 1.3 O FENÔMENO DA DESORDEM INTRÍNSECA..... | 21 |
| 2. RECONHECIMENTO DA INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO..... | 25 |
| 2.2 MECANISMOS DE INTERAÇÃO INTERMOLECULARES..... | 28 |
| 2.3 COMPLEXOS ANTÍGENO-ANTICORPO NO PDB..... | 30 |
| 3. DINÂMICA MOLECULAR..... | 37 |
| 3.1 CAMPOS DE FORÇA..... | 38 |
| 3.2 ALGORITMOS E ENSEMBLES ESTATÍSTICOS..... | 40 |
| 3.3 DINÂMICA MOLECULAR COM AMOSTRAGEM AMPLIADA..... | 41 |
| 3.3.1 Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics (HREMD)..... | 44 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 47 |
| 4.1 ANÁLISE ESTRUTURAL..... | 47 |
| 4.2 MOBILIDADE PROTEICA..... | 49 |
| 4.3 ÁREA DE SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE..... | 50 |
| 4.4 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS POR MÉTODOS HIERÁRQUICOS..... | 51 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 53 |
| 5.1 ANÁLISE ESTRUTURAL..... | 53 |
| 5.2 DINÂMICA MOLECULAR..... | 54 |
| 5.2.1 Mobilidade protéica do epítopo da PfAMA1..... | 54 |
| 5.2.1.1 Estrutura terciária..... | 59 |
| 5.2.2 Conjuntos conformacionais..... | 63 |
| 5.2.3 Interações intermoleculares e CDRs..... | 70 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 78 |
| REFERÊNCIAS..... | 80 |

CAPÍTULO 1

1. PROTEÍNA ANTÍGENO DE MEMBRANA APICAL 1 (*Pf*AMA1)

1.1 CICLO DE VIDA DA MALÁRIA

A malária é uma doença endêmica compreendida no grupo das chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Sua transmissão se dá pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles* infectada, e tem como agente etiológico os protozoários *Plasmodium spp.* O *Plasmodium falciparum* (*Pf*) é identificado como a espécie causadora da forma mais agressiva e letal da doença (World Health Organization 2022).

Dentre diversos desafios para o desenvolvimento de tratamentos eficazes contra a malária (Beeson et al., 2019; Minkah & Kappe, 2021), podemos destacar quatro: o complexo ciclo de vida do parasita, o proteoma do *Pf* formado pelas chamadas Proteínas Intrinsecamente Desordenadas (seção 1.3), e as capacidades do *Pf* de permanecer em estado latente durante a infecção no fígado e modificação das suas proteínas de superfície a cada nova fase do ciclo de vida. Estes dois últimos fatores estão diretamente relacionados à evasão do ataque de anticorpos.

A Figura 1.1a mostra o ciclo de vida malária dividido em três grandes fases: 1) o ciclo esporogônico que acontece dentro do agente transmissor infectado, em que há a maturação dos plasmódios em fase de esporozoítos; 2) o ciclo exoeritrocítico em que os esporozoítos são inoculados no hospedeiro humano, e nesta fase o parasita permanece em estado latente no fígado até seu amadurecimento para os estágios esquizonte e merozoítos, dificultando a identificação do parasita pelos anticorpos do hospedeiro (Figura 1.1b); e 3) o ciclo eritrocítico, em que o parasita invade os eritrócitos, se multiplica e se diferencia assexuadamente em microgametócitos e macrogametócitos (Njoroge et al., 2014).

por pontes dissulfeto intramoleculares (Coley et al., 2001). Esta proteína compreende uma região ectoplasmática de cerca de 550 resíduos e possui três domínios que apresentam regiões de desordem e oito pontes dissulfeto intramoleculares: o domínio I, N-terminal que é o mais estruturado; o domínio II central e o domínio C-terminal III, em que há maior presença das regiões desordenadas (Igonet et al., 2007).

Os três domínios apresentam estruturas experimentais, no entanto, devido às diversas regiões desordenadas ao longo de suas sequências, os domínios II e III possuem menos regiões resolvidas disponíveis para estudos no *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (Escalante et al., 2001). O arranjo quaternário destes domínios pode ser visualizado na Figura 1.2 a partir de modelos propostos pelo AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

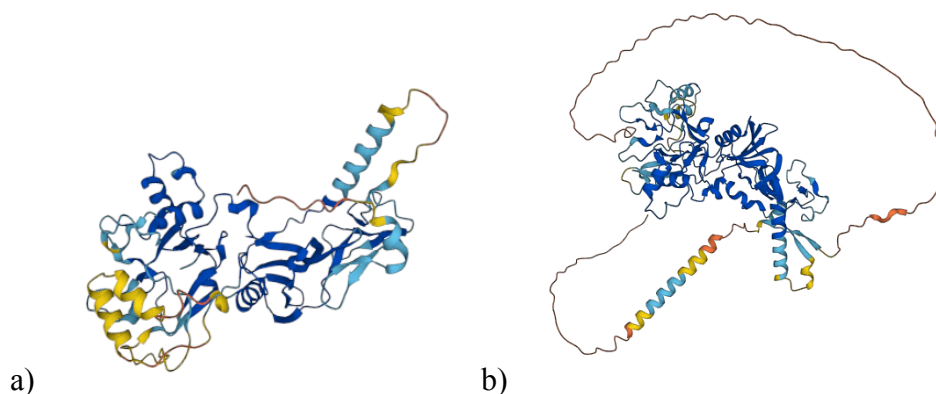


Figura 1.2 Modelos do arranjo quaternário da *PfAMA1* (a) AlphaFold2:D9MYA2 e (b) AlphaFold2:C5HWE3.

A *PfAMA1* é encontrada no formato merozoíto e esporozoíto durante a invasão das células hepáticas e sanguíneas, respectivamente. Sabe-se que esta é uma proteína de reorientação no chamado “movimento de junção”, momento em que a membrana do parasita e do hospedeiro estão em contato. A adesão do parasita às células humanas é seguida de um movimento de reorientação necessário para que o pólo apical entre em contato com as superfícies do eritrócito ou do hepatócito (Lim et al., 2014) (Figura 1.3). Esta proteína possui um sítio hidrofóbico conservado que, durante a invasão, realiza interação com o peptídeo RON2 (*Rhoptry Neck 2*). Como anticorpos anti-AMA1 e outras moléculas inibidoras são capazes de bloquear esta interação, portanto, visando o impedimento da invasão de eritrócitos

pelo parasita, a *PfAMA1* é um alvo atraente no desenvolvimento de novos antimaláricos (Vulliez-Le Normand et al., 2017).

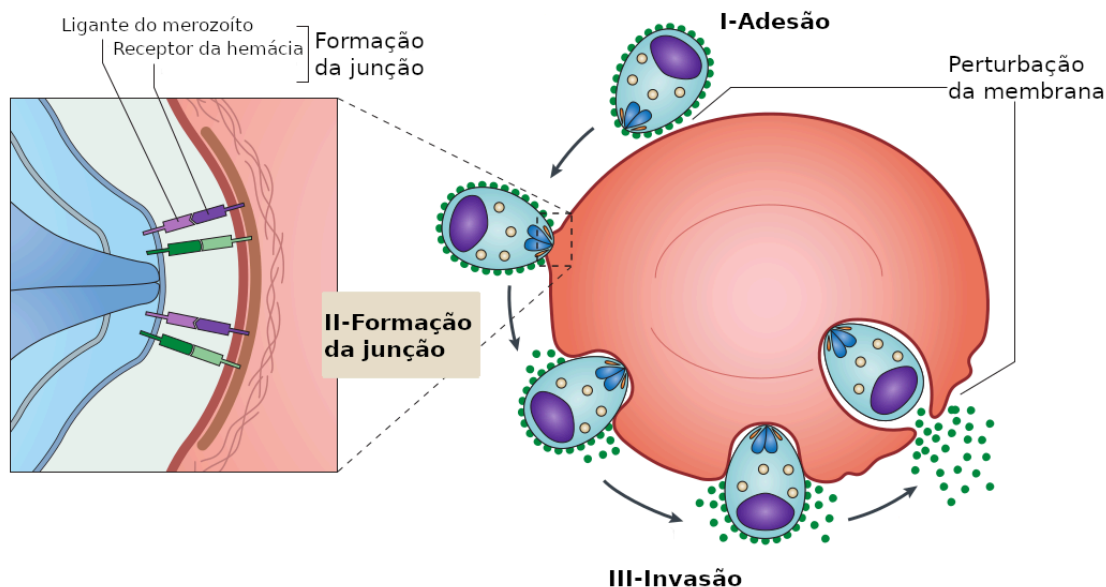


Figura 1.3 AMA1 atuando na reorientação do parasita durante o movimento de junção (Adaptado de (De Niz et al., 2017)).

Estudos mostram que os diferentes domínios da AMA1 foram capazes de produzir resposta imunológica, e que uma possibilidade para superar os desafios inerentes à malária são proteínas multialelo recombinantes que possuem atuação conjunta de regiões estruturadas e desordenadas. Este é o caso da primeira vacina recentemente aprovada RTS,S, a *mosquitrix* (Laurens, 2020). O estudo de (Nair et al., 2002) mostra que a afinidade de anticorpos humanos purificados contra epítomos do domínio III da *PfAMA1* inibiu a invasão do parasita, e (Mueller et al., 2003) também destacam a importância de epítomos nessa região, uma vez que peptídeos sintéticos que mimetizam a região de *loop* do domínio III foram utilizados como imunogênicos para geração de anticorpos monoclonais. Um nível alto de inibição do crescimento do parasita foi observado, cerca de 95%.

Os métodos computacionais podem contribuir na compreensão das regiões desordenadas e estruturadas, ao fornecer uma descrição atomística dos sistemas, suas estabilidades, dinâmica e flexibilidade, provendo informações complementares aos métodos experimentais. Este trabalho empregou o método de Dinâmica Molecular (DM) com amostragem ampliada por trocas de réplicas hamiltonianas (*Hamiltonian Replica Exchange*

Molecular Dynamics - HREMD) visando compreender o mecanismo de interação de um epítipo conformacional do domínio III da *Pf*AMA1 com a região de variabilidade do anticorpo monoclonal Fab F8.12.19, e a influência de regiões desordenadas para descrição conformacional de mecanismos antimaláricos importantes.

1.3 O FENÔMENO DA DESORDEM INTRÍNSECA

As Proteínas Intrinsecamente Desordenadas (*Intrinsically Disordered Proteins* - IDPs) e Regiões de Desordem (*Intrinsically Disordered Regions* - IDRs) do *Pf* fazem parte dos processos de adesão, invasão e reconhecimento do parasita no hospedeiro (Gomes et al., 2011). Devido à complexidade dessas proteínas altamente flexíveis e suas funções relacionadas à sobrevivência do parasita, a influência da desordem intrínseca no ciclo de vida da malária para a eficácia da resposta imunológica não pode ser subestimada (Guy et al., 2015; Krishnarjuna et al., 2018).

O conceito de “desordem intrínseca” tem emergido com grande relevância e impacto na compreensão da função das proteínas e também de respostas imunológicas adaptativas (Rangarajan et al., 2015; P. E. Wright & Jane Dyson, 1999). Proteínas que têm acima de 30% de desordem estrutural em suas sequências são classificadas como IDPs, apresentando heterogeneidade estrutural e ausência de estrutura secundária e terciária bem definida em ambiente fisiológico (Deiana et al., 2019).

Estima-se que 70% dos genomas associados a doenças tenham regiões que apresentam desordem intrínseca, justificando o interesse na compreensão desse fenômeno em possíveis alvos farmacológicos (McCarthy et al., 2011). Seu papel em doenças degenerativas, bem como sua disfunção em processos celulares de separação de fases líquido-líquido como em Alzheimer, câncer e diabetes é conhecido (Borcherds et al., 2021; Deiana et al., 2019). Devido ao seu comportamento diversificado, a desordem intrínseca também é observada em doenças virais e parasitárias, como é o caso do *Pf*, sendo também cogitada como parte do mecanismo de sobrevivência do parasita (Mishra et al., 2020). No ciclo de vida da malária, as IDPs e IDRs detêm um papel importante, uma vez que fazem parte das proteínas de superfície relacionadas à adesão e invasão das células humanas. A alta variabilidade apresentada por essas proteínas auxilia no escape da resposta humoral imune devido às

mudanças na expressão de superfície em cada nova fase do ciclo de vida, e interações de baixa afinidade com anticorpos. Esses fatores levam o organismo humano à necessidade de produção de anticorpos que devem ser reconhecidos eficientemente nas diferentes fases, de prevenção da infecção, prevenção da doença e prevenção da transmissão (Julien & Wardemann, 2019).

Uma pesquisa bibliográfica no Google Acadêmico considerando o período de 1990 a 2022, utilizando as palavras-chave: “(*intrinsically OR natively OR inherently*) AND (*disordered OR unfolded OR unstructured OR flexible*) AND (*protein OR proteins*)”, e relacionando-as às publicações de Dinâmica Molecular e malária, mostra que embora esta doença seja objeto de interesse em estudos, seu aparecimento em trabalhos teóricos de DM ainda é discreto, como mostra a linha verde na Figura 1.4. Isto equivale a cerca de 1,5 a 2% dos artigos totais de IDPs e DM, justificando a necessidade de se compreender mais sobre as IDPs e IDRs de proteínas da malária em nível atômico e molecular.

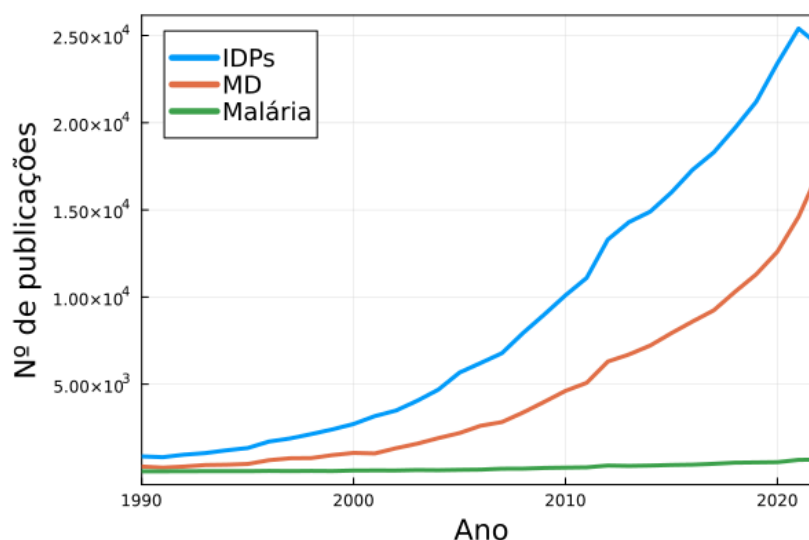


Figura 1.4 Número de publicações entre 1990 e 2022 utilizando Proteínas Intrinsecamente Desordenadas (IDPs), Dinâmica Molecular e Malária em seu escopo.

Um auxílio importante na compreensão de regiões desordenadas em proteínas são os bancos de dados de desordem que realizam curadoria manual da literatura. O MobiDB, um dos bancos disponíveis mais completos de ferramentas para compreender a desordem intrínseca, possui anotações de consenso em artigos científicos, informações derivadas de

métodos experimentais, homologia e até mesmo preditores no estado-da-arte, como o AlphaFold2. Dentre as proteínas mais relevantes do *Pf*, a Figura 1.5a mostra as mais citadas na literatura e o seu aparecimento ainda limitado em estudos de DM. 19 proteínas, dentre elas a AMA1, e suas contribuições de desordem para os domínios que são anotados no MobiDB são também mostradas na Figura 1.5b.

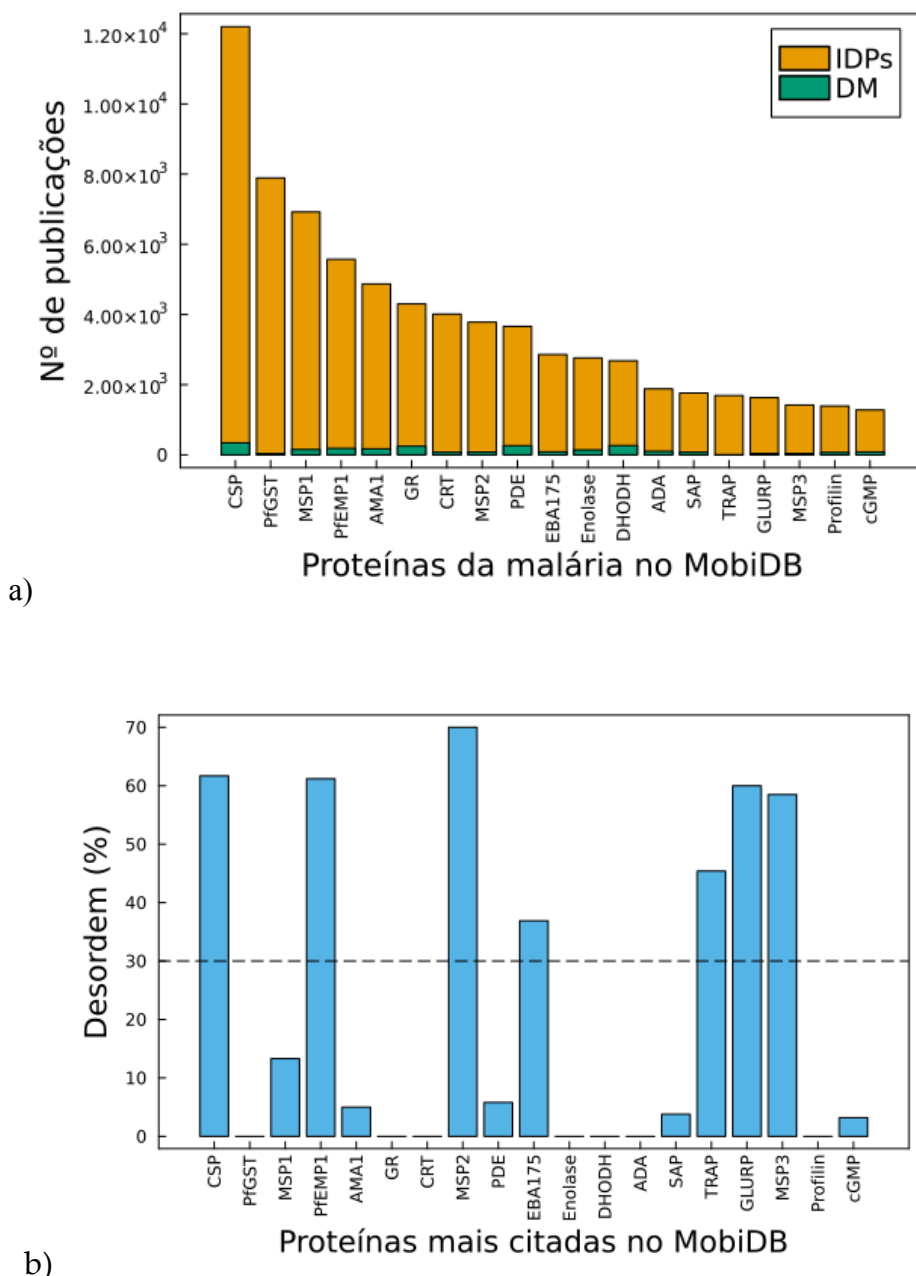


Figura 1.5 IDPs disponíveis no MobiDB mais citados na literatura.

Dentre as proteínas mais citadas, CSP, *PfEMP1*, MSP2, EBA-175, TRAP, GLURP e

MSP3 têm acima de 30% de desordem. A proteína CSP (*circumsporozoite protein*), a mais citada em artigos e com percentual de desordem elevado foi utilizada para a construção da vacina *Mosquitrix* aprovada contra a malária (Almeida et al., 2021).

A emergência da era da bioquímica molecular não-estruturada compreende proteínas não apenas como pacotes enovelados que obedecem o paradigma estrutura-função (Fischer, 1894), mas estruturas dinâmicas que podem ter comportamentos diversos, e cujas regiões desordenadas possuem funções complementares às funções ordenadas (Clerc et al., 2021). As IDPs e IDRs participam de processos de interações com alta especificidade e baixa afinidade, desempenhando papéis de regulação e sinalização de processos celulares. Por sua flexibilidade, as IDPs são capazes de interagir com diversos alvos como proteínas estruturadas, carboidratos, membranas, pequenas moléculas, peptídeos e outros, apresentando também comportamentos diversificados de desordem-desordem e desordem-ordem em relação à estrutura nativa (Fatafta et al., 2021).

CAPÍTULO 2

2. RECONHECIMENTO DA INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO

O combate efetivo do sistema imunológico à invasão de um patógeno, é devido sua interação com as células B ou T do organismo humano que possuem moléculas receptoras capazes de reconhecer antígenos de formas distintas. As células B (Figura 2.1a) realizam multiplicação e expansão clonal, e posterior secreção de anticorpos com modificações específicas necessárias para o combate patogênico (Cyster & Allen, 2019).

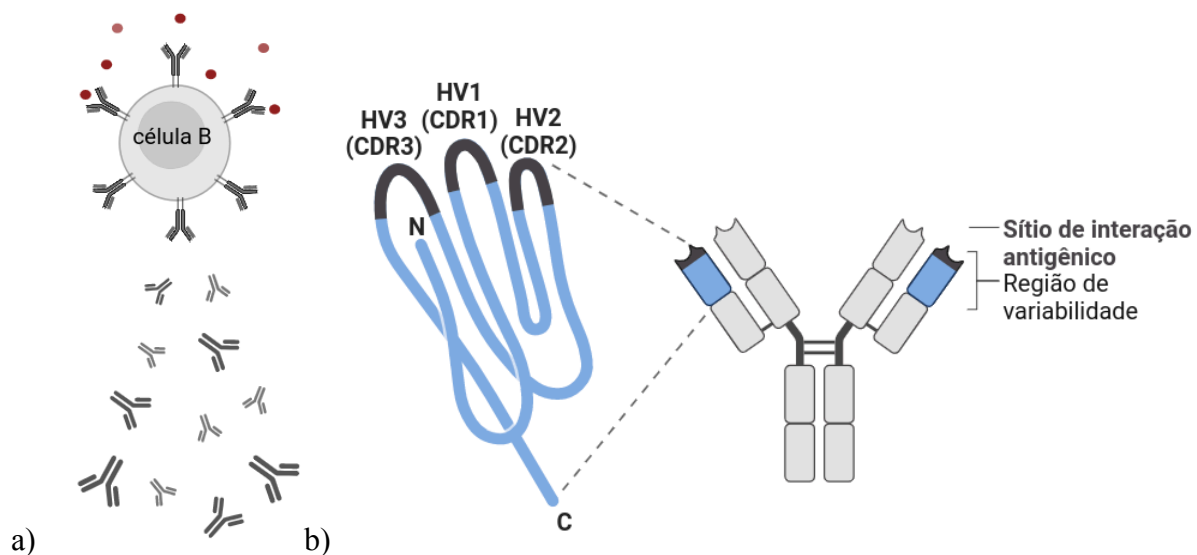


Figura 2.1 (a) Interação específica de anticorpos produzidos por células B e (b) Estrutura básica de um anticorpo Ig. Figuras geradas com (Biorender, 2021).

Com estrutura em formato de Y, um anticorpo Ig é tipicamente constituído por unidades estruturais básicas com duas grandes cadeias pesadas e duas cadeias leves. A região final da estrutura abrange a região C-terminal, que de maneira geral é fixa e muito semelhante em todos os anticorpos. As extremidades N-terminal do anticorpo, por onde a interação com o antígeno é realizada, é o chamado fragmento Fab (*Fragment antigen-binding*). Em seu ápice, há uma região hipervariável (*Fragment variable - Fv*). Esta região de variabilidade reconhece elementos específicos e têm suas cadeias de aminoácidos modificadas, permitindo

primária contínua de aminoácidos na proteína, ou conformacionais (Figura 2.2b), também chamados de descontínuos, que são encontrados no enovelamento da proteína e compostos por diversos fragmentos dispersos ao longo da sequência (Yao et al., 2013).

A maioria das interações epítipo-parótopo (Figura 2.3) são realizadas via epítomos conformacionais, que são frequentemente reconhecidos em interações que produzem resposta imunológica efetiva (Healer et al., 2004; Parvizpour et al., 2020). No entanto, regiões de desordem em proteínas podem realizar interações antigênicas via epítomos lineares, cuja antigenicidade está ligada a uma maior área de superfície acessível ao solvente do que a observada em epítomos ordenados. Estas interações possuem alta especificidade devido à maior exposição dos resíduos que proporcionam uma região de contato maior no parótopo de anticorpos (Krishnarjuna et al., 2018).

A capacidade de produção de resposta imunológica efetiva de interações de epítomos desordenados do *Pf*-anticorpo não é clara, uma vez que elas podem também funcionar como um mecanismo de “cortina de fumaça” afastando os anticorpos das regiões que provoquem resposta efetiva, garantindo a sobrevivência do parasita (MacRaild et al., 2016).

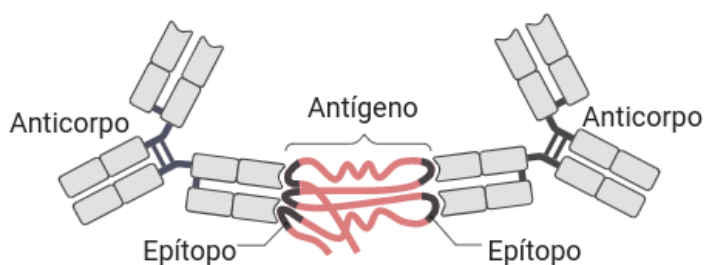


Figura 2.3 Reconhecimento do epítipo de antígenos (parte escura da molécula em vermelho) pelo parótopo de anticorpos Ig (em cinza).

Os epítomos conformacionais se formam quando sequências distantes na proteína se aproximam após o enovelamento sendo estabilizadas pelas interações intramoleculares. De maneira geral, apresentam conformações mais compactas e com áreas de superfície menores.

No caso da *PfAMA1*, estes fragmentos de aminoácidos permanecem em sua característica funcional através das pontes dissulfeto entre os domínios (Coley et al., 2001).

A eficácia da resposta imune dependerá de quão bem os anticorpos disponíveis se ligam aos epítomos acessíveis na superfície do invasor, pois o processo de reconhecimento molecular é essencial para a neutralização do patógeno. A maioria dessas interações têm um custo entrópico, em que a energia de dobramento da interação é compensada por um aumento da heterogeneidade estrutural do restante da proteína. Nesse sentido, é necessário colocar em perspectiva como a desordem estrutural do epítomo afeta a formação do complexo e a interação preferencial do anticorpo com epítomos lineares ou conformacionais (J. Tan et al., 2019).

Em uma situação de máxima afinidade, a conformação do epítomo no complexo tem um molde perfeito do sítio de ligação do parótopo, com uma distribuição de carga de superfície complementar. Outro fator determinante para a afinidade e especificidade de um complexo antígeno-anticorpo é a flexibilidade conformacional. À semelhança do que acontece na interação entre proteínas e pequenas moléculas, quanto maior for a flexibilidade do epítomo, maior será a sua capacidade de sofrer uma mudança conformacional (MacRaild et al., 2018).

2.2 MECANISMOS DE INTERAÇÃO INTERMOLECULARES

Nas interações proteína-proteína (IPP), a conformação de uma proteína serve como um ambiente, um conjunto de pré-condições para a proteína parceira (Kovács et al., 2005). Devido a promiscuidade protéica, a capacidade de ter comportamentos diferenciados com alvos diferenciados, diversos mecanismos de interação podem ser observados, e embora esses eventos não sejam necessariamente bem demarcados, eles podem ser compreendidos e revelar a importância de interações e o ambiente protéico em uma IPP. Suas ocorrências e importâncias funcionais são observadas em estudos experimentais como de raios X, microscopia crioeletrônica, estudos cinéticos, e de Ressonância Magnética Nuclear (Csermely et al., 2010).

Os mecanismos de interação mostram um amplo repertório de estados conformacionais que podem ser adotados por proteínas estruturadas ou desordenadas na presença ou ausência de ligantes e parceiros, incluindo conformações correspondentes à forma ligada. A descrição do reconhecimento biomolecular é importante para desenvolvimento de terapêuticos, uma vez que abrangem as IPP, interações proteína-ligante e substrato desde as etapas de sinalização até metabolismo celular (Hatzakis, 2014).

Os modelos mais amplamente reportados na literatura são chave-fechadura (Fischer, 1894), ajuste induzido (Koshland, 1958) e seleção conformacional (Ma et al., 1999). Autores indicam que IDPs podem realizar a combinação destes mecanismos (Choura & Rebaï, 2021).

O modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer, em que proteínas são moléculas rígidas bem empacotadas cujos sítios de interação possuem formatos complementares ao do respectivo alvo já foi superado. Embora seja possível observá-lo em interações enzima-substrato, este modelo possui limitações devido à plasticidade que mesmo proteínas estruturadas apresentam (Koshland, 1958) (Figura 2.4a).

No modelo de ajuste induzido (Figura 2.4b), o parceiro rígido induz uma mudança conformacional no parceiro flexível. À medida que a aproximação acontece, surgem forças eletrostáticas e interações de Hidrogênio que alteram o cenário energético. Neste modelo, a dobragem deve acontecer após a interação, e o estado ligado da proteína flexível apresenta conformações não observadas no estado livre ou na ausência do ambiente do parceiro. Embora a proteína flexível perca graus de liberdade durante o evento de ligação, o ganho de entalpia não é compensado por um custo entrópico significativo para a proteína rígida (Choura & Rebaï, 2021; Csermely et al., 2010).

Por outro lado, na seleção conformacional (Figura 2.4c), uma das conformações enoveladas ou de estados metaestáveis pré-existentes liga-se ao parceiro. Neste caso, a proteína dinamicamente flutuante tem uma das conformações compatíveis com a ligação selecionadas pelo parceiro, concentrando assim, todo o conjunto conformacional para aquele determinado estado. Há uma preferência por subconjuntos de conformações acessíveis que serão estabilizadas, deslocando o equilíbrio neste sentido e modulando a atividade ou conjunto funcional destas proteínas. Outros nomes para a seleção conformacional são: seleção de população, deslocamento de população, ajuste selecionado e estabilização de conjuntos conformacionais. Este mecanismo explica, inclusive, o dobramento de estruturas completamente desordenadas após a ligação (Hatzakis, 2014).

Autores entendem, no entanto, que proteínas podem seguir diferentes trajetórias de ligação que envolvem múltiplas etapas com barreiras energéticas. Proteínas com muitas regiões de desordem ou muito flexíveis podem ter mecanismos de ligação que não se encaixam na classificação acima. Devido a isto, estudos sugerem um modelo de seleção conformacional estendido no qual a separação entre os eventos do ajuste induzido e da seleção conformacional não é clara. A seleção conformacional pode ser seguida de um ajuste induzido e de ajustes mútuos entre os componentes participantes. Como os diferentes cenários podem mudar os mecanismos de interação, mais recentemente, propõe-se que os modelos chave-fechadura, ajuste-induzido e seleção conformacional são, na verdade, casos particulares da seleção conformacional estendida (Chakraborty & Di Cera, 2017). Para classificar experimentalmente os mecanismos, é necessário, pelo menos, a determinação das constantes de velocidade de ligação para diferentes concentrações de ligantes (Vogt & Di Cera, 2013).

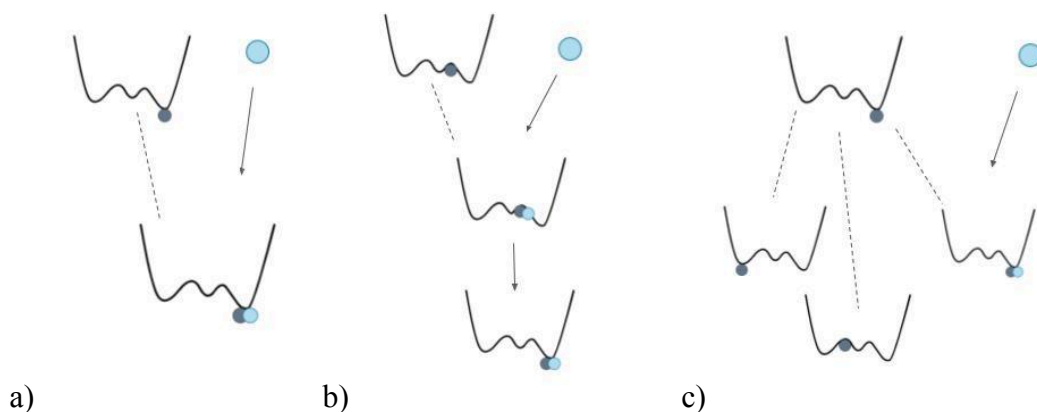


Figura 2.4 Representação esquemática de mecanismos de interação intermoleculares (a) chave-fechadura, (b) ajuste induzido e (c) seleção conformacional.

2.3 COMPLEXOS ANTÍGENO-ANTICORPO NO PDB

Há 117 PDB IDs com evidência experimental do *Pf* em complexo com anticorpos humanos e de camundongos. Dentre essas estruturas, há uma diversidade de 12 proteínas, elas são: CyRPA, AMA1, CSP, EBA-175, MSP1, MSP2, Pfs25, PfSUB1, RH5, Pfs48/45, Fab668, Pfs230, RIFIN, CRT, EMP1, and Pfs230D1M. Na Tabela 2.1 estão as proteínas

disponíveis e as indicações de epítomos nos domínios. Para compreender as influências das regiões de desordem nos antígenos do *Pf*, foi utilizado o servidor RAPID (Yan et al., 2013), que correlaciona a sequência de aminoácidos com o percentual de desordem. Algumas estruturas, como o peptídeo NANP das proteínas CSP e MSP2, são muito curtas, não sendo possível realizar a predição de desordem. Além disso, em geral, as regiões N e C terminais das proteínas são conhecidamente desordenadas.

Tabela 2.1 Estruturas dos complexos antígeno-anticorpo disponíveis no PDB.

| Proteína | Região do epítopo | Desordem (%) | IDs PDB | Tipo de anticorpo | Referência |
|----------------|--------------------------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------|--------------------------|
| CyRPA | Cysteine-Rich Protective Antigen 6 bladed domain | 0.9 | 5TIH | <i>Mouse</i> | (L. Chen et al., 2017) |
| | Cysteine-Rich Protective Antigen 6 bladed domain | 10.36 | 5EZO | <i>Mouse</i> | (Favuzza et al., 2017) |
| | - | 1.17 | 7PHW, 7PI7, 7PI2, 7PHV, 7PI3 | <i>Mouse</i> | (Ragotte et al., 2022) |
| AMA1 | Domain I | 5.65 | 2Q8B, 2Q8A | <i>Mouse</i> | (Coley et al., 2007) |
| | Domain III | 10.0 | 2J5L | <i>Mouse</i> | (Igonet et al., 2007) |
| EBA-175 | Region ii Duffy binding domain | 12.13 | 4QEX, 4K2U | <i>Mouse</i> | (E. Chen et al., 2013) |
| MSP1 | MSP1-19 | 6.06 | 1OB1 | <i>Mouse</i> | (Pizarro et al., 2003) |
| | MSP1 EGF domain 1 | 6.06 | 6XQW | <i>Human</i> | (Thouvenel et al., 2021) |
| MSP2 | C terminal | - | 5TBD, 4067 | <i>Mouse</i> | (Seow et al., 2017) |
| | N terminal | - | 4QXT, 4QY8, 4QYO, 4R3S | <i>Mouse</i> | (Morales et al., 2015) |

Tabela 2.1 Estruturas dos complexos antígeno-anticorpo disponíveis no PDB (continuação).

| Proteína | Região do epítipo | Desordem (%) | IDs PDB | Tipo de anticorpo | Referência |
|-----------------|------------------------------------|--------------|------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Pfs25 | Pvs28 EGF domain | 1.64 | 6B08, 6B0A, 6AZZ, 6B0E, 6B0H, 6B0G | <i>Human</i> | (Scally et al., 2017) |
| | Pvs28 EGF domain | 2.17 | 6PHC, 6PHB, 6PHC, 6PHD, 6PHF | <i>Human</i> | (McLeod et al., 2019) |
| PfSUB1 | SUB1 protease Prodomain ProdP9 | 1.74 | 4LVN, 4LVO | <i>Mouse</i> | (Withers-Martinez et al., 2014) |
| RH5 | Rh5 coiled-coil domain | 11.67 | 5MI0 | <i>Mouse</i> | (Campeotto et al., 2017) |
| | 3D7 | 16.17 | 7PHU | <i>Human</i> | (Ragotte et al., 2022) |
| | Rh5 coiled-coil domain | 11.03 | 4U0Q, 4U0R, 4U1G | <i>Human</i> | (K. E. Wright et al., 2014) |
| | Rh5 coiled-coil domain | 16.17 | 6RCV, 6RCS, 6RCU, 6RCV | <i>Human</i> | (Alanine et al., 2019) |
| Pfs48/45 | Sexual stage antigen s48/45 domain | 5.88 | 6H5N | <i>Mouse</i> | (Lennartz et al., 2018) |
| | 6C variant | 6.12 | 7UNB | <i>Human</i> | (McLeod et al., 2022) |
| | Sexual stage antigen s48/45 domain | 6.47 | 6E62, 6E63 | <i>Mouse</i> | (Kundu et al., 2018) |
| | - | 3.03 | 7ZWI | <i>Mouse</i> | (Ko et al., 2022) |
| Fab668 | Junctional peptide | | 6PBV | <i>Human</i> | (Oyen et al., 2020) |
| Pfs230 | - | 20.51 | 7JUM | <i>Human</i> | (Coelho et al., 2021) |
| RIFIN | V2 domain | 17.22 | 7KHF, 7KFK | <i>Human</i> | (Y. Chen et al., 2021) |
| | Immunoglobulin domain | 16.56 | 7F9L, 7F9M, 7F9N | <i>Human</i> | (Xie et al., 2021) |
| CRT | CRT-like | 6.25 | 6UKJ | <i>Human</i> | (Kim et al., 2019) |
| EMP1 | Duffy binding domain | 21.31 | 5MZA | <i>Human</i> | (Lennartz et al., 2017) |

Tabela 2.1 Estruturas dos complexos antígeno-anticorpo disponíveis no PDB (continuação).

| Proteína | Região do epítipo | Desordem (%) | IDs PDB | Tipo de anticorpo | Referência |
|------------------|--------------------------|---------------------|------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Pfs230D1M | - | 20.51 | 6OHG | <i>Mouse</i> | (Singh et al., 2020) |
| | C-terminal a TSR domain | 23.1 | 6B0S | <i>Human</i> | (Scally et al., 2018) |
| | NANP repeat region | - | 5BKO | <i>Human</i> | - |
| | - | 99.9 | 6AZM | <i>Human</i> | (Triller et al., 2017) |
| | - | | 6AXK, 6AXL | <i>Human</i> | (Oyen et al., 2017) |
| | NANP5 | 99.9 | 6D11, 6D01 | <i>Human</i> | (Imkeller et al., 2018) |
| | - | 99.9 | 6ULE | <i>Human</i> | (Murugan et al., 2020) |
| | - | 50.0 | 6MB3 | <i>Human</i> | (Oyen et al., 2018) |
| | - | 99.9 | 6UUD | <i>Mouse</i> | (Thai et al., 2020) |
| | - | 50.0 | 6MHG | <i>Human</i> | (Oyen et al., 2018) |
| | NPNA2 peptide, B domain | - | 6WFW, 6W00, 6W05, 6WFW, 6WFX, 6WG1, 6WG2 | <i>Human</i> | (Pholcharee et al., 2021) |
| | NPNA4 | - | 6WFY | <i>Human</i> | (Pholcharee et al., 2021) |
| | NPNA3 | - | 6WFZ, 6WG0 | <i>Human</i> | (Pholcharee et al., 2021) |
| | NANP3 | - | 6D0X | <i>Human</i> | (Imkeller et al., 2018) |
| | RTS,S/AS01 | - | 6UC5 | <i>Human</i> | (Pholcharee et al., 2020) |
| CSP | - | 93.33 | 7RD9, 7LKB, 7LKG, 7RAJ, 7RCS, 7RD3, 7RD4, 7RD9, 7RDA | <i>Mouse</i> | (Kratochvil et al., 2021) |

Tabela 2.1 Estruturas dos complexos antígeno-anticorpo disponíveis no PDB (continuação).

| Proteína | Região do epítopo | Desordem (%) | IDs PDB | Tipo de anticorpo | Referência |
|----------|-------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------|
| CSP | - | 36.36 | 7RXL, 7RXI, 7RXJ, 7RXL, 7RXP, 7S0X | Human | (Beutler et al., 2022) |
| | - | - | 6B5L, 6B5M, 6B5N, 6B5O, 6B5P, 6B5R, 6B5S, 6B5T | Human | (Kisalu et al., 2018) |
| | NANP5 | 99.9 | 6O23, 6O23, 6O24, 6O25, 6O26, 6O28, 6O29, 6O2A, 6O2B, 6O2C, 6ULE, 6ULF, 6VLN | Human | (Murugan et al., 2020) |
| | - | - | 7K75 | Human | - |

Os domínios das proteínas CSP disponíveis são totalmente desordenados, enquanto há sete proteínas com desordem acima de 20%. A fim de identificar estudos computacionais antígeno-anticorpo já desenvolvidos, uma busca no Google Acadêmico relacionando os PDB IDs com a palavra-chave “*Molecular Dynamics*” mostra que dentre os complexos disponíveis na Tabela 2.1, apenas 16 aparecem citados em artigos de estudos teóricos, mas, em sua maioria, a DM não é o principal método utilizado. O foco principal desses trabalhos consiste em modelagem por homologia, docagem molecular e utilização de DM como informação de apoio a outros métodos. Em sua maioria, os PDBs IDs buscados também não são foco principal dos trabalhos em que são citados, aparecendo de maneira secundária como referências ou exemplificações.

Foram encontradas simulações de DM das estruturas 2Q8B, 2J5L, 6B0S, 1OB1 e 5MZA, devido o método não ser o objetivo central dos trabalhos, alguns resultados de DM para essas proteínas não estão disponíveis.

Dentre as estruturas para as quais encontramos simulações, 2Q8A e 2J5L correspondem aos domínios I e III da AMA1, respectivamente. A 2Q8B é citada no artigo apenas como suporte para trabalhos experimentais (Delgadillo et al., 2016). A estrutura 2J5L foi utilizada

em docagem molecular e DM para filtragem de potenciais fármacos (Nguyen et al., 2022) e verificação do potencial mimetizado de interações com simulações de docagem de proteínas. Também foi usada para testar ferramentas de alinhamento de sequência para comparação de modelos de proteínas (Beaudoin et al., 2021).

Diferentes domínios da proteína CSP foram utilizados em estudos. Fernández-Quintero *et al.*, 2022 (Fernández-Quintero et al., 2022) realizaram o DM da estrutura 6B0S, que corresponde a uma região C-terminal, com um conjunto de estruturas para caracterização de transições conformacionais entre estruturas ligadas e não ligadas. Os domínios I de 6AZM, 6AXK foram usados em um estudo de cristalografia (Oyen et al., 2020) e microscopia crioeletrônica para comparação de referenciais teóricos e experimentais (Oyen et al., 2018). A estrutura 6D01 foi utilizada como modelo para alinhamento de hélice transmembrana a partir da orientação por DM (Nivedha et al., 2023).

O PDB ID 1OB1, domínio I da proteína MSP1, foi a estrutura inicial de uma simulação DM combinada com docagem molecular para entender as interações do complexo proteína-anticorpo (Serrano et al., 2009). A 5TBD, região C-terminal da proteína MSP2, foi usada como modelo para a construção de peptídeos homodímeros para simulação de DM (Seow et al., 2021).

O anticorpo do complexo 6B5L foi utilizado em estudo de vacina polipeptídica para docagem molecular com os epítomos de interesse (Pritam et al., 2020). 6B5P, 4K2U, 4QXT e 6PHB foram utilizados para modelagem de estruturas de anticorpos (Albuquerque et al., 2022), e posteriormente, foi realizada a DM das estruturas modeladas a partir de 4QXT (Krishnarjuna et al., 2018) e 6PHB (Sookpongthai et al., 2021).

(Mahita et al., 2022) realizam um estudo de modelagem estrutural, docagem e análise de interações antígeno-anticorpos com diversos complexos, dentre eles o 6AZZ da proteína Pfs25.

Apenas o trecho CD147 da proteína RH5, de ID 4U0Q, foi usado para determinar o sítio de ligação para posterior docagem e DM (Helal et al., 2022). Esta proteína também faz parte de estudos para construção de uma vacina multiepítopo (Bemani et al., 2020).

O estudo de (Kim et al., 2021) indica que a proteína CRT, de ID 6UKJ, participa do transporte de múltiplas drogas envolvidas na resistência a doenças infecciosas, e (Wicht et al., 2022) realizam modelagem molecular a partir da mesma estrutura. O domínio de interação da 5MZA, da proteína EMP1, foi usado em estudos de docagem e DM, mas o objetivo do

trabalho não era relacionado à malária (Kciuk et al., 2022; Mosharaf et al., 2022) (Godara et al., 2022). Por fim, a 4LVN, que corresponde a proteína PfSUB1 foi utilizada em um estudo de docagem (Gogoi et al., n.d.).

É possível concluir que ainda há muito a ser explorado no campo dos estudos computacionais para entender a dinâmica das proteínas da malária, especificamente do *Pf*; a dinâmica conformacional e interações com anticorpos são questões cruciais as quais estudos de DM podem contribuir para o desenvolvimento de vacinas e descoberta de alvos. Várias proteínas da malária permanecem pouco estudadas, citadas de maneira secundária e não utilizadas como objeto principal de trabalhos robustos de DM. Também coloca-se em perspectiva que fatores que contribuem para este cenário são as complexidades técnicas ainda a serem superadas em estudos e análises de IDPs que formam o *Pf* (Burki, 2022).

CAPÍTULO 3

3. DINÂMICA MOLECULAR

Dinâmica Molecular (DM) é a denominação do conjunto de métodos de simulação computacional para estudo de sistemas atômico-moleculares, levando em consideração a movimentação das partículas individuais (átomos, moléculas) e condições termodinâmicas. As simulações de DM permitem estudar a evolução temporal das configurações constituintes de um sistema e, a partir das posições geradas e usando conceitos de mecânica estatística, calcular propriedades observáveis macroscópicas. As trajetórias são obtidas frequentemente pela resolução numérica de equações de movimento de Newton da mecânica clássica com passos de tempo discretos (são obtidos, assim, coordenadas e momentos conjugados do sistema, ao longo do tempo) (L. Martínez et al., 2007). Desta forma, a DM é uma ferramenta importante para a compreensão de movimentos moleculares complexos, como a variabilidade conformacional de macromoléculas, em particular de proteínas. Métodos experimentais podem ser utilizados para orientar e inspirar as simulações, enquanto estas fornecem uma perspectiva complementar microscópica para fenômenos observados experimentalmente (Salo-Ahen et al., 2020). *Softwares* amplamente utilizados em DM são GROMACS (Abraham et al., 2015), Amber (Case et al., 2021) e NAMD (Fiorin et al., 2020).

A produção de uma DM depende de diversas etapas para obter uma representação adequada das posições e velocidades das partículas. Estas etapas envolvem técnicas específicas, desde a montagem da caixa de simulação, com íons e configurações iniciais do sistema, até cálculo das forças, movimento das partículas e controle da simulação, como observado de maneira sequencial e simplificada na Figura 3.1.

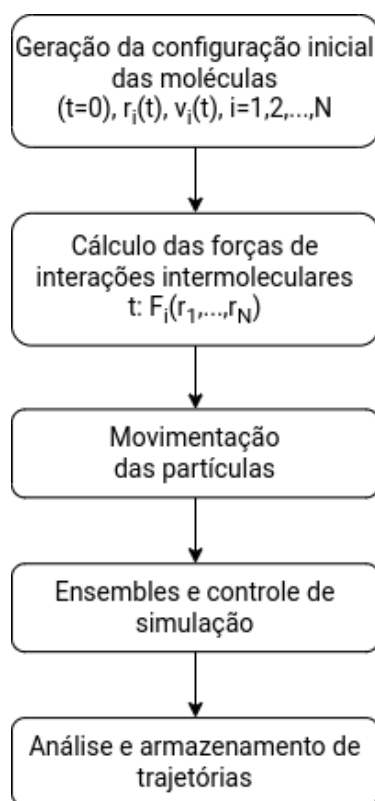


Figura 3.1 Etapas da simulação de Dinâmica Molecular. Adaptado de (L. Martínez et al., 2007).

3.1 CAMPOS DE FORÇA

Dadas as configurações iniciais, a sequência de configurações geradas para o sistema depende de uma representação adequada do potencial de interação entre os átomos. O conjunto de parâmetros e formas funcionais usados para calcular os potenciais de interação de um sistema é chamado de campo de força (Karplus & McCammon, 2002). Os campos de força são expressões matemáticas que descrevem a dependência da energia de um sistema com as coordenadas de suas partículas. Os parâmetros são obtidos a partir dos cálculos mecânico-quânticos *ab initio* e semi-empíricos, ou pelo ajuste de dados experimentais (González, 2011).

A maioria dos campos de força tem 5 termos com interpretações físicas: 1) Deformações de comprimento de ligação, associados a ligações covalentes; 2) torções de

ângulos entre ligações; 3) rotação de ângulos diedrais; 4) termos associados a diedros impróprios, para modelar grupos com geometria plana e quiralidade (Monticelli & Tieleman, 2013); 5) os chamados termos não-ligados, que descrevem as interações eletrostáticas e de van der Waals (dispersão e repulsão) dependentes da distância entre átomos de moléculas distintas ou distantes em uma mesma molécula. A função de energia é, portanto, a soma de todos estes termos, como representado na Equação 1,

$$E = \sum_{\text{ligações}} E_{\text{deformações}} + \sum_{\text{ângulos}} E_{\text{flexão}} + \sum_{\text{diedros}} E_{\text{rotação}} + \sum_{\text{impróprios}} + \sum_{\text{pares}} E_{\text{não-ligados}} \quad \text{Eq.1}$$

onde cada termo depende das coordenadas de subconjuntos de átomos na simulação para os quais os os termos se aplicam.

Os campos de força de DM mais utilizados na simulação de proteínas são: Amber (Best & Hummer, 2009), CHARMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*) (Liwo, 2018), GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*) (Scott et al., 1999) and OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) (Robertson et al., 2015).

O CHARMM22 (MacKerell et al., 1998) foi o primeiro campo de força *all atom* do conjunto CHARMM e é a base de todas as suas demais atualizações de campos de força atomísticos, como CHARMM22/CMAP (Mackerell et al., 2004), CHARMM27 (MacKerell et al., 2000), CHARMM36 (Best et al., 2012) e CHARMM36m (Huang et al., 2017). Primariamente, sua parametrização utilizou simulações de fase gasosa e ajustes da mecânica quântica com interações de fragmentos biomoleculares e água para obter cargas parciais. O campo de força CHARMM36 é um dos mais utilizados para a simulação de proteínas, com aditivo do potencial CMAP, que refina as características da distribuição dos ângulos de torção ϕ , ψ da cadeia principal da proteína. O CHARMM36m é um refinamento com maior precisão na geração de conjuntos conformacionais de estrutura polipeptídica para peptídeos e IDPs, parametrizado para melhor reproduzir regiões flexíveis (Mackerell, 2004), (Best, 2019). Este campo de força obteve a amostragem de estruturas secundárias em α -hélice em IDPs em concordância significativa com dados de Ressonância Magnética Nuclear (Huang et al., 2017).

3.2 ALGORITMOS E ENSEMBLES ESTATÍSTICOS

No estudo de sistemas dentro da aproximação clássica, as Leis de Movimento de Newton são utilizadas para prever a posição espacial de cada átomo em função do tempo, e as acelerações são obtidas a partir das forças do sistema molecular (Hollingsworth & Dror, 2018). A equação de movimento para um sistema de N partículas pode ser formulada como a seguinte equação diferencial de segunda ordem para cada partícula (Eq. 2),

$$m_i a_i(t) = F_i(r_i(t), \dots, r_N(t)) \quad \text{Eq. 2}$$

onde m_i é a massa da partícula, $a_i(t)$ é a aceleração da partícula i no instante t , e $F_i(t)$ é a força atuando sobre a partícula, que depende das coordenadas de todas as partículas do sistema, $\{r_i(t)\}$ no instante t .

Em particular, percorremos o tempo, calculando repetidamente as forças em cada átomo e depois usando essas forças para atualizar a posição e a velocidade de cada átomo em um instante de tempo posterior, assumindo acelerações constantes no intervalo de tempo. Assim, as trajetórias podem ser propagadas no tempo usando integração numérica das equações de movimento. Podem ser empregados, por exemplo, os algoritmos de Verlet (Verlet, 1967) e seus derivados *leap-frog* (Van Gunsteren & Berendsen, 1988) e Verlet-velocidade (Swope et al., 1982) para resolução das equações diferenciais.

No algoritmo de Verlet, a evolução temporal é obtida utilizando as posições e acelerações dos átomos no tempo t e do passo anterior. Se $r_i(t)$, é a posição do átomo i no instante t , as posições em um tempo posterior ($t + \Delta t$) são dadas pela Eq. 3,

$$r_i(t + \Delta t) \simeq -r_i(t - \Delta t) + 2r_i(t) + \frac{\Delta t^2}{m} F_i(t), \quad \text{Eq. 3}$$

onde m é a massa da partícula e Δt é o passo de tempo da integração numérica.

A modificação *leap-frog* do algoritmo de Verlet é implementada no software GROMACS como padrão. Neste algoritmo, a velocidade é calculada explicitamente e há uma maior precisão numérica, em que são utilizadas a posição e a força no tempo t e a velocidade

na metade do intervalo de tempo $t + \frac{1}{2}\Delta t$. O nome deste algoritmo, “salto do sapo”, faz referência ao fato de que a velocidade salta sobre coordenada para fornecer o próximo valor de meio passo da velocidade, que é então usado para calcular as novas posições (Hug, 2013).

Enquanto as partículas se movimentam, para que as simulações gerem conjuntos de estruturas representativos de condições termodinâmicas experimentais, é possível manter parâmetros macroscópicos constantes. Dependendo de quais variáveis de estado são mantidas fixas, diferentes conjuntos estatísticos podem ser gerados, os chamados *ensembles*. Um *ensemble* é um conjunto de réplicas do sistema que permite o cálculo de diversas funções termodinâmicas a partir das flutuações das propriedades no conjunto gerado. Cada *ensemble* corresponde a equações de estado que diferem entre si pela forma como são geradas as coordenadas e o momento das partículas, nas simulações. Comumente, os conjuntos NVT, NVE, NPT, NpT e μ VT são empregados, mantendo constantes funções diferentes de acordo com as propriedades que se deseja calcular, sendo Temperatura, Volume, Energia, Pressão e número de partículas. (S. (johnathan) Tan et al., 2020).

Como as estruturas de biomoléculas, em particular aquelas que apresentam desordem intrínseca, possuem alta diversidade conformacional, os custos computacionais para explorar o espaço conformacional são altos. Qualquer observável é uma média sobre o conjunto de estruturas heterogêneas, o que dificulta o uso de técnicas convencionais de química estrutural. Dessa forma, métodos de amostragem ampliada são importantes para obter conjuntos de conformações consistentes com as estruturas proteicas em solução (Best, 2017; Fatafta et al., 2021).

3.3 DINÂMICA MOLECULAR COM AMOSTRAGEM AMPLIADA

Alguns trabalhos indicam que uma boa amostragem é mais determinante para a qualidade dos resultados de uma simulação do que os detalhes dos campos de força utilizados (Shrestha et al., 2021). O problema de amostragem em simulações moleculares pode ser minimizado por métodos de simulação com amostragem ampliada. Esses métodos modificam as simulações para permitir a amostragem de porções maiores do espaço conformacional em sistemas complexos. No caso de proteínas muito flexíveis, a DM pode, a princípio, fornecer

uma boa amostragem da variabilidade conformacional, no entanto é necessário que a simulação não fique presa em conformações não representativas, em mínimos locais de energia (Liao, 2020).

Hénin *et al.*, 2022 (Hénin et al., 2022) indicam que a eficiência dos métodos de amostragem ampliada depende da aplicação, da escolha dos parâmetros e da experiência do pesquisador. Os métodos de amostragem ampliada podem ser classificados pela adoção ou não de variáveis coletivas (VC), e pela exploração da paisagem de energia livre ao longo da trajetória.

Os métodos que não adotam VC (*CV-Free*) amostram configurações biomoleculares sem conhecimento a priori da coordenada de reação; eles são úteis para explorar possíveis caminhos de transição estrutural e determinar possíveis estados intermediários insuspeitos. É realizado um passeio aleatório no espaço de energia potencial para superar a dificuldade de sistemas complexos com muitos graus de liberdade (Miao & McCammon, 2016). Estes métodos englobam simulações que exploram flutuações térmicas para aumentar a frequência de superação de barreiras de energia livre. Pode-se citar a DM por troca de réplicas (*Replica Exchange Molecular Dynamics* - REMD) (Sugita & Okamoto, 1999), troca de réplica com temperatura de soluto (*Replica Exchange Solute Tempering*) (Wang et al., 2011), DM acelerada (*Accelerated Molecular Dynamics*) (Hamelberg et al., 2004) e dinâmica molecular de Langevin autoguiada (*Self-guided Molecular Dynamics*) (Wu et al., 2016).

Métodos baseados em coordenadas de reação (ou variáveis coletivas - *CV-Based*), são métodos em que alguma força é adicionada ao sistema para induzir o movimento na direção da VC de interesse. Essas técnicas podem explorar o conhecimento dos estados finais para encontrar o caminho mínimo de energia livre, exploram também a diferença de energia entre estados fora do equilíbrio (*Out-of-equilibrium/Driven methods*), como DM dirigida (*Steered Molecular Dynamics*) (Izrailev et al., 1999) e perturbação de energia livre (*Free Energy Perturbation* - FEP) (Kollman, 1993), e também a adição de um viés às forças interatômicas para potencializar a população de regiões de alta energia livre (Harpole & Delemotte, 2018), como métodos baseados em distribuição de potencial e probabilidade, os mais conhecidos são a amostragem guarda-chuva (*Umbrella Sampling* - US) (Torrie & Valleau, 1977) e metadinâmica (MTD) (Liao, 2020).

Estes métodos nos quais é necessário definir uma coordenada de reação amostram um espaço de configurações bem definido. Métodos como a força de viés adaptativa (*Adaptive*

Biasing Force) (Darve et al., 2008) consistem em um potencial decorrente da força média que se adapta à resistência que o meio exerce à evolução de um sistema agindo em uma determinada direção; Os métodos fora do equilíbrio envolvem forçar o sistema a seguir um caminho predeterminado para uma VC ou um parâmetro alquímico (Hénin et al., 2022), em que, por exemplo, o sistema no estado A é transformado no estado B por interpolação. E, por fim, as simulações enviesadas favorecem a amostragem de regiões de maior estabilidade termodinâmica, ou, no caso de serem desconhecidas, nivelam a amostragem para uma distribuição mais uniforme. Desta forma, uma distribuição de probabilidade distinta do alvo é amostrada, de modo que a proporção das duas distribuições seja conhecida ou estimada numericamente. O objetivo é focar nas configurações que mais contribuem para quaisquer médias de interesse.

Dentre os métodos de amostragem ampliada apresentados, REMD, US e MTD são extensamente conhecidos em estudos de simulações de proteínas (Sinha et al., n.d.), (Schor et al., 2016), (Bernetti et al., 2017), (Zhang et al., 2012). MTD e REMD possuem conjuntos de diferentes variações que são utilizadas de acordo com o sistema a ser analisado e as aplicações necessárias. Além disso, é comum que se opte por métodos híbridos, a combinação de métodos com amostragem ampliada com diferentes princípios (Kobayashi et al., 2017). É importante destacar que a escolha dos métodos também depende do poder computacional disponível. Neste trabalho vamos destacar a troca de réplicas hamiltonianas.

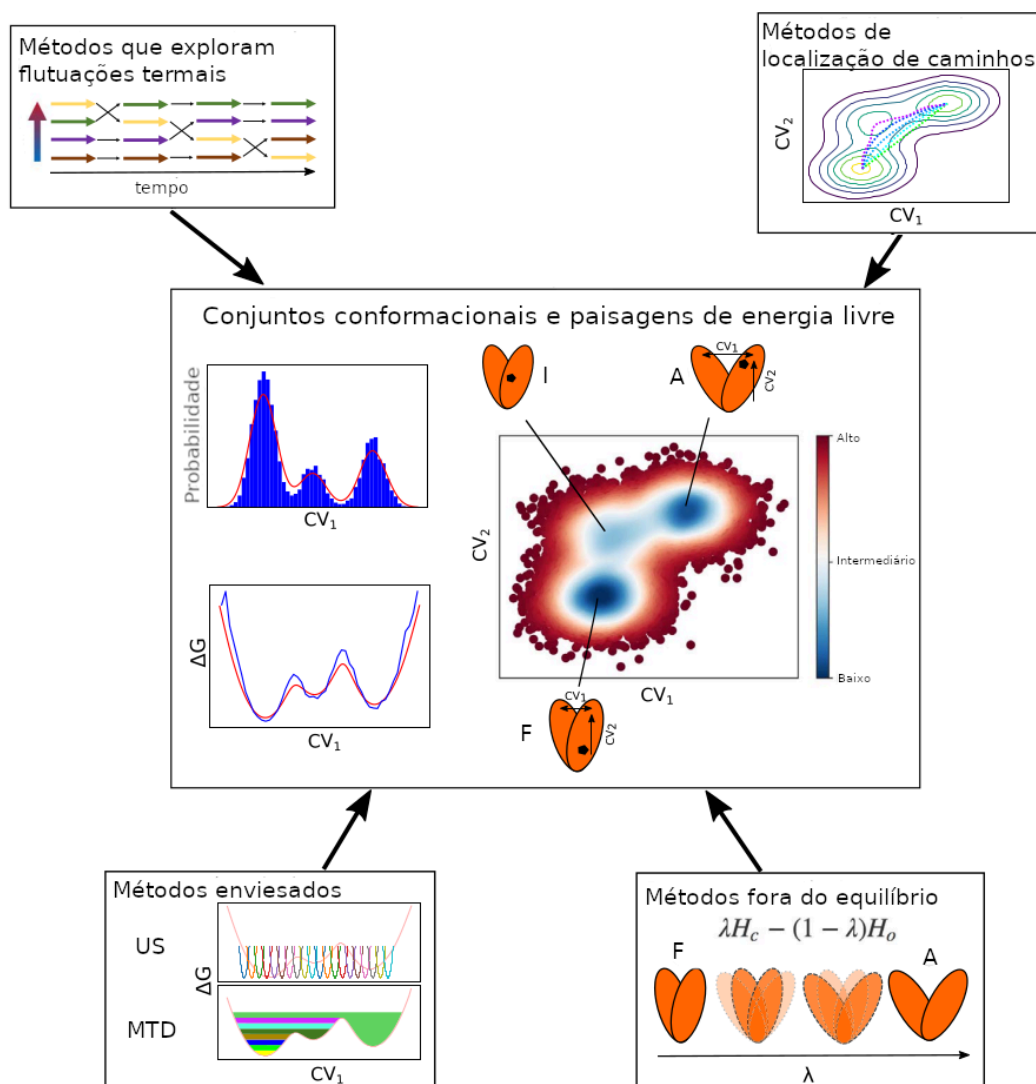


Figura 3.2 Classificação de métodos de amostragem ampliada baseados no uso de variáveis coletivas. Adaptado de (Harpole & Delemotte, 2018). Onde (F) é o estado fechado ou enovelado, (I) é o intermediário e (A) é o estado aberto ou desenovelado.

3.3.1 *Hamiltonian Replica Exchange Molecular Dynamics (HREMD)*

A DM por troca de réplicas (*Replica Exchange Molecular Dynamics - REMD*) é um método em que réplicas independentes do sistema são simuladas por DM, e há a tentativa de intercâmbio entre as estruturas das simulações paralelas. Na REMD, tentativas de trocas de réplicas em diferentes temperaturas são feitas periodicamente, e as trocas são aceitas ou rejeitadas pelo critério Metropolis (Metropolis et al., 1953), que garante uma condição de

equilíbrio detalhada em que as probabilidades de transição entre quaisquer dois estados do sistema é igual nos sentidos direto e inverso, em função de suas populações. As probabilidades de cada estado, por sua vez, são calculadas usando a distribuição de Boltzmann de acordo com a energia potencial de cada sistema (Eq. 6):

$$\frac{P(i \rightarrow j)}{P(j \rightarrow i)} = e^{-(V_j - V_i)/kT} \quad \text{Eq. 6}$$

onde V_j e V_i são as energias potenciais das configurações, k é a constante de Boltzmann, e T é a temperatura. O critério de Metropolis consiste em:

Se $P_j > P_i$, então j aceito com $P = 1$;

Se $P_j < P_i$, então j aceito com $\frac{P_j}{P_i}$.

Se uma tentativa de intercâmbio é bem sucedida, as temperaturas das réplicas envolvidas são trocadas e as velocidades são reescaladas (Peng et al., 2014). As trocas ocorrem com alguma probabilidade apreciável quando há sobreposição de energias potenciais entre simulações adjacentes e selecionadas. Uma taxa de troca de 30% é adequada (Qi et al., 2018). Assim, uma vantagem do REMD é que a probabilidade de troca é rapidamente determinada pelas características do sistema e seus movimentos aceitos por pesos estatísticos conhecidos (Hénin et al., 2022).

Dentre as técnicas de REMD, a troca de réplicas por modificação de temperatura (TREMMD) e o REMD hamiltoniano (HREMMD) são as mais conhecidas. O método HREMMD, utilizado neste trabalho, é uma forma mais geral de amostragem replicada envolvendo trocas entre diferentes hamiltonianos; enquanto o TREMMD acelera a amostragem variando o parâmetro de temperatura. O HREMMD tem a vantagem de melhorar a amostragem com potenciais de escala, e permitir a aceleração de subconjuntos do sistema. Desta forma, parte-se de réplicas independentes modificando os potenciais, utilizando o Hamiltoniano como réplica-coordenada, mas permitindo o intercâmbio entre os respectivos conjuntos (Voronin et al., 2020). O Hamiltoniano é perturbado e variado entre réplicas, e a energia potencial é dimensionada podendo ser direcionada a partes específicas do sistema (Bernardi et al., 2015). O número de réplicas é selecionado de acordo com o tamanho do sistema e a diferença entre os estados mais altos e mais baixos (Bussi, 2014).

Os potenciais são escalados por fatores < 1 , e são relacionados por aproximação ao fator de temperatura (Figura 3.3).

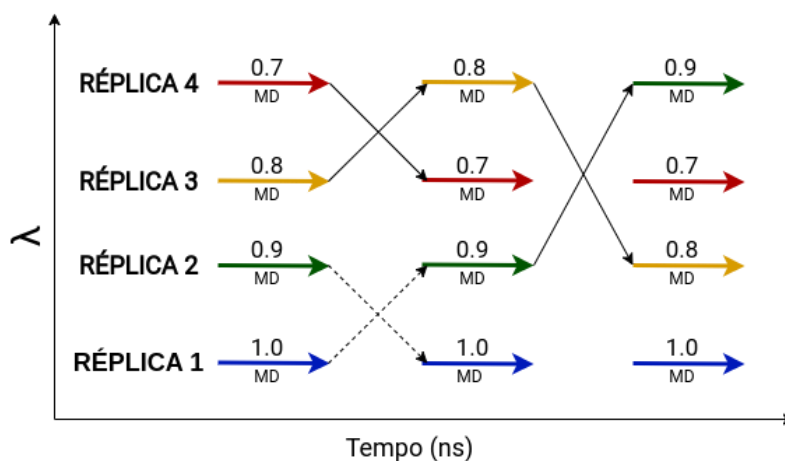


Figura 3.3 Visão geral da DM utilizando troca de réplicas e escalonando os potenciais.

Há uma gama de *softwares* que permitem aos usuários executar e analisar simulações de amostragem ampliada com ênfase em biomoléculas. Estes programas são compostos por conjuntos de campos de força e conjunto de programas de simulação (Qi et al., 2018), e extensões podem ser utilizadas para aceleração da amostragem, como é o caso do PLUMED (Bonomi et al., 2009) implementado junto ao GROMACS (Abraham et al., 2015).

CAPÍTULO 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE ESTRUTURAL

Igonet e colaboradores (Igonet et al., 2007) determinaram a estrutura cristalográfica de um trecho do domínio III da proteína AMA1, região indicada como de interação antigênica com os anticorpos. Este epítipo em complexo com a região de variabilidade do anticorpo monoclonal F8.12.19 foi depositado no PDB com o código 2J5L (Figura 4.1).

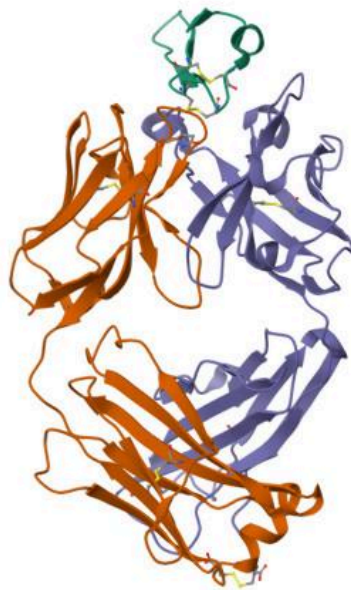
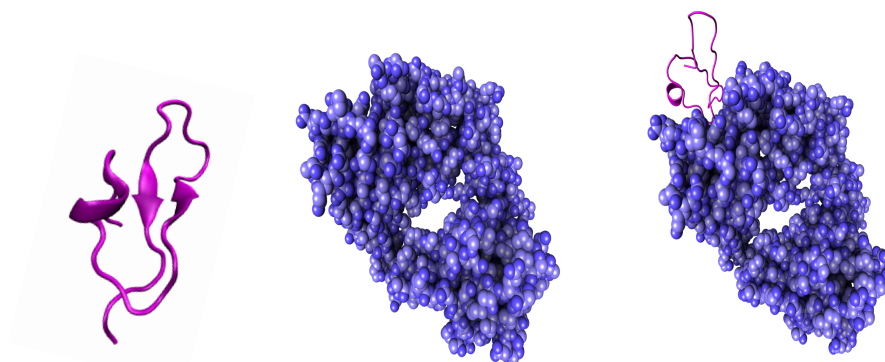


Figura 4.1 Estrutura do complexo (PDB id. 2J5L). Epítipo do Domínio III da *Pf*AMA1 em verde e cadeias do anticorpo em roxo e laranja.

A região Fab do anticorpo monoclonal F8.12.19 recombinante reconhece o epítipo conformacional localizado no domínio III, e ambas as estruturas são apresentadas em complexo. Este anticorpo foi construído para a região ectoplasmática da AMA1 do *Plasmodium vivax*, e apresentou reação cruzada com homólogos de outras espécies de Plasmodium, dentre eles, o *falciparum*, foco deste trabalho.

O epítipo foi submetido a análise de desordem no DISOPRED3 (Jones & Cozzetto, 2015), e no RAPID *webserver* (*Regression-based Accurate Prediction of protein Intrinsic Disorder content*) (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/RAPID/>) (Yan et al., 2013) que fornece o percentual de desordem da estrutura.

As estruturas PDB foram submetidas a DM no *software* GROMACS 2019.4 utilizando o campo de força CHARMM36m e modelo de água TIP3P-CHARMM modified (Huang et al., 2017), a partir da construção de três sistemas: 1) epítipo isolado da estrutura 2J5L em água; 2) anticorpo livre em água; e 3) complexo antígeno-anticorpo (Figura 4.2). As caixas de simulação foram geradas utilizando o comando *solvate* do *software* Packmol (J. M. Martínez & Martínez, 2003; L. Martínez et al., 2009), que permite adicionar os íons Na⁺ e Cl⁻ necessários para neutralização e indicar uma tolerância de 2 Å entre átomos, minimizando as interações repulsivas entre os átomos na configuração inicial. O tempo de equilíbrio foi de 1 ns para cada sistema e foram realizadas as simulações HREMD para os três sistemas com 10 réplicas com mesma estrutura inicial. No mínimo, houve quatro simulações-teste sucessivas de 50 ns, escalonadas com λ entre 0.6 e 1.0, em intervalos em torno de 0.3. O $\lambda = 1.0$ refere-se às réplicas não-perturbadas. No sistema A, o escalonamento foi aplicado em todo o epítipo enquanto nos sistemas B e C o escalonamento foi concentrado apenas nas regiões correspondentes às CDRs do anticorpo. As taxas de troca adequadas em torno de 30% (Qi et al., 2018) foram observadas no escalonamento a partir de 0.71. Portanto, a partir destas faixas foram realizadas as simulações HREMD de 500ns, totalizando 5 μ s de simulação para cada sistema e tentativas de trocas a cada 1000 passos, considerando todas as réplicas.



| Sistemas | A | B | C |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| λ / réplica | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| | 0.96 | 0.96 | 0.96 |
| | 0.92 | 0.92 | 0.92 |
| | 0.89 | 0.89 | 0.89 |
| | 0.86 | 0.86 | 0.86 |
| | 0.82 | 0.82 | 0.82 |
| | 0.79 | 0.79 | 0.79 |
| | 0.76 | 0.76 | 0.76 |
| | 0.73 | 0.73 | 0.73 |
| | 0.71 | 0.71 | 0.71 |
| réplicas | 10 réplicas | 10 réplicas | 10 réplicas |
| Tempo/réplica | 500 ns | 500 ns | 500 ns |

Figura 4.2 Sistemas submetidos à simulação de Dinâmica Molecular e os parâmetros de escalonamento usados na troca de réplicas hamiltonianas.

4.2 MOBILIDADE PROTEICA

A raiz do desvio quadrático médio (*Root Mean Square Deviation* - RMSD) é uma medida da distância média entre átomos de estruturas sobrepostas. Neste caso, o RMSD foi calculado com relação à estrutura cristalográfica.

A raiz quadrada da flutuação quadrática média (*Root Mean Square Fluctuation* - RMSF) é uma medida de flexibilidade por átomo, ou por resíduo, da cadeia, que mostra as coordenadas de oscilação dos trechos de uma proteína em torno de uma estrutura de

referência. Esta medida é útil para visualizar quais resíduos estão com mais mobilidade espacial. O RMSD (Eq. 8) e o RMSF (Eq. 9) foram calculados usando os programas *gmx rms* e *gms rmsf* do GROMACS 2019.4, respectivamente, de acordo com as equações usuais,

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{it} - x_{it_0})^2 + (y_{it} - y_{it_0})^2 + (z_{it} - z_{it_0})^2} \quad \text{Eq. 8}$$

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{i=1}^t (x_i^{ref} - x_i)^2 + (y_i^{ref} - y_i)^2 + (z_i^{ref} - z_i)^2} \quad \text{Eq. 9}$$

onde n é o número total de átomos e as coordenadas x , y e z em diferentes instantes t e t_0 .

Uma forma de verificar a influência da fração de subconjuntos estruturais no RMSD e no RMSF é utilizando o *software* MDlovoFit (L. Martínez, 2015). Altos valores de RMSD e RMSF nem sempre refletem a variabilidade estrutural de forma clara, uma vez que os cálculos envolvendo alinhamento de estruturas rígidas são sensíveis às flutuações conformacionais de seus subconjuntos.

Para verificar se os valores correspondem a flutuações globais ou apenas a pequenos subgrupos estruturais, o MDlovoFit utiliza a teoria de otimização de menor valor ordenado (*Low-Order-Value-Optimization* - LOVO) (Andreani et al., 2008), que minimiza o valor mínimo de uma função objetivo de um conjunto de funções concorrentes no mesmo domínio. Os alinhamentos para subconjuntos da proteína são realizados detectando automaticamente átomos com menor RMSD para diferentes frações do número total de carbonos- α ($C\alpha$).

Essas análises permitem observar o período de equilíbrio, a qualidade das simulações, agrupar conformações semelhantes, e verificar a estabilidade de uma estrutura na escala de tempo a partir das coordenadas iniciais (Sargsyan et al., 2017).

4.3 ÁREA DE SUPERFÍCIE ACESSÍVEL AO SOLVENTE

A área de superfície acessível ao solvente (*Solvent Accessible Surface Area* - SASA) foi calculada através da implementação *gmx sasa* do *software* GROMACS 2019.4 (Eisenhaber et

al., 1995). Esta análise é especialmente importante em estudos envolvendo IDPs devido a dependência da antigenicidade de resíduos da acessibilidade ao solvente e aos seu parceiros, já que as interações realizadas por epítomos desordenados envolvem SASAs maiores do que aquelas realizadas por epítomos estruturados, tendo relação com uma maior especificidade nas interações (MacRaid et al., 2016).

De acordo com (Marsh & Teichmann, 2011), a análise de SASA também permite prever a magnitude das mudanças conformacionais induzidas por interações a partir da chamada SASA relativa (S_{rel}) para estados livres e ligados da molécula, que quando correlacionada ao RMSD, é uma medida simples da flexibilidade proteica. Neste trabalho, a S_{rel} foi calculada como indicado na Eq. 10 ,

$$S_{rel} = \frac{SASA_t}{SASA_c} \quad \text{Eq. 10}$$

onde $SASA_t$ é o SASA obtido ao longo da trajetória de DM em relação ao $SASA_c$, obtido da pose cristalográfica.

4.4 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS POR MÉTODOS HIERÁRQUICOS

As conformações obtidas foram clusterizadas utilizando a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (*Hierarchical Clustering Analysis* - HCA). Esta é uma análise não supervisionada de reconhecimento de padrões com base no perfil multivariado das amostras. As amostras são agrupadas em árvores hierárquicas em que os comprimentos das linhas, que seriam os “galhos das árvores”, indicam as similaridades entre elas, sendo assim é uma análise útil para visualização de amostras com comportamento diferenciado no conjunto de dados ou na trajetória de DM. O HCA é uma método aglomerativo que considera cada pose como um grupo unitário e, a partir dela, o agrupamento é realizado sistematicamente (Ferreira, 2015). A principal forma de determinar o quanto as conformações são semelhantes é sua proximidade no espaço multidimensional, neste caso, a proximidade entre elas foi calculada com o *software* TTClust (Tubiana et al., 2018) com algoritmo Ward (Ward, 1963), tendo como base a propriedade de interesse em cada ponto da trajetória.

A distância entre os agrupamentos é calculada por uma combinação linear da soma dos quadrados das distâncias do centróide médio de cada grupo (Eq. 11),

$$d_{(AB)C}^2 = \frac{(n_A + n_B)}{n_A + n_B + n_C} d_{AC}^2 + \frac{(n_B + n_C)}{n_A + n_B + n_C} d_{BC}^2 - \frac{n_C d_{AB}^2}{n_A + n_B + n_C} d_{AB}^2 \quad \text{Eq. 11}$$

onde n é o número de objetos existentes em cada grupo de cada tipo, e d é a distância entre o grupo AB e o grupo C. Os dois grupos que tiverem o menor acréscimo na soma quadrática total são unidos. A clusterização permite identificar os grupos mais relevantes, a variabilidade conformacional e as similaridades entre os estados acessados pela DM.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE ESTRUTURAL

A Figura 5.1 mostra o gráfico de desordem da proteína *PfAMA1* obtida pelo servidor DISOPRED3. As regiões desordenadas são consideradas acima da pontuação de 0.5. A literatura indica que esta proteína tem cerca de 27% de desordem (Guy et al., 2015), e como observado na Figura 5.1, os domínios II e III contribuem significativamente para este número. O domínio III, onde fica localizado o epítipo da estrutura PDB:2J5L, tem uma contribuição de 10% de desordem e corresponde à região de pico do gráfico com sequência de aminoácidos de 479 a 512.

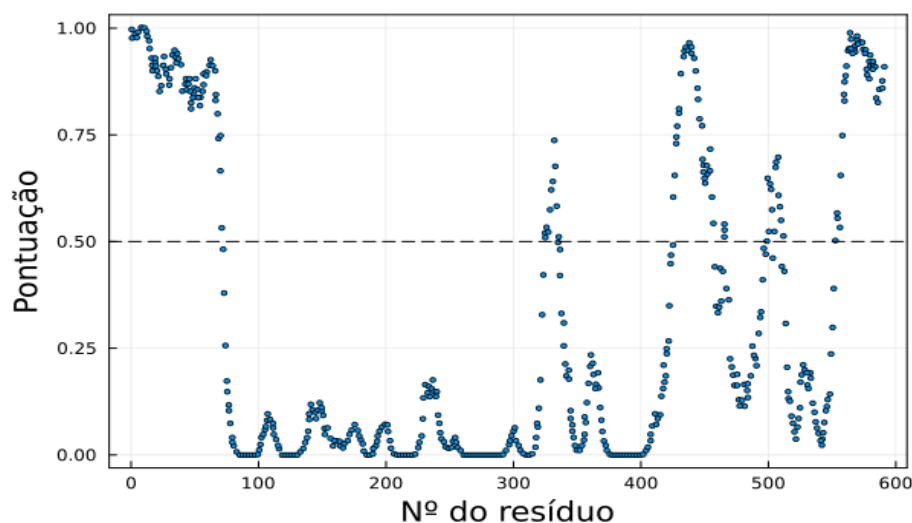


Figura 5.1 Estimativa de desordem obtida pelo servidor DISOPRED3 para a proteína *PfAMA1*. Regiões com pontuação maior que 0.5 são consideradas desordenadas.

Considerando que este epítipo é localizado em uma região que possui uma contribuição de desordem razoável e a importância deste fenômeno nas proteínas da malária, através da DM também é possível compreender o quanto essas regiões altamente flexíveis foram determinantes para a variabilidade conformacional do epítipo e sua interação com o anticorpo.

5.2 DINÂMICA MOLECULAR

5.2.1 Mobilidade protéica do epítopo da *PfAMA1*

É possível comparar a flexibilidade do epítopo livre e do epítopo em complexo com o anticorpo para verificar a influência da proteína parceira na sua mobilidade.

Na Figura 5.2 estão as densidades de RMSDs do epítopo no estado livre e ligado e do Raio de Giro (RG) *versus* RMSD do epítopo. O gráfico na Figura 5.2a mostra que, nos dois estados, as dispersões dos valores de RMSD estão próximas e há uma amostragem razoável de RMSDs próximos aos valores de até 0.25 nm, o que ainda é considerado a reprodução do modo de ligação da pose cristalográfica (Kirchmair et al., 2008). Isto pode ser indicativo da relevância funcional desta pose. Ainda é possível dizer que a proximidade da sobreposição nas dispersões indica que, no estado livre, o epítopo apresenta conformações com RMSDs também observados em estado ligado. A maior diferença de RMSDs entre esses dois estados situa-se na região do gráfico de 0.5 nm até 1.0 nm, que corresponde à conformações acessadas apenas em estado livre, como mostra a curva em roxo.

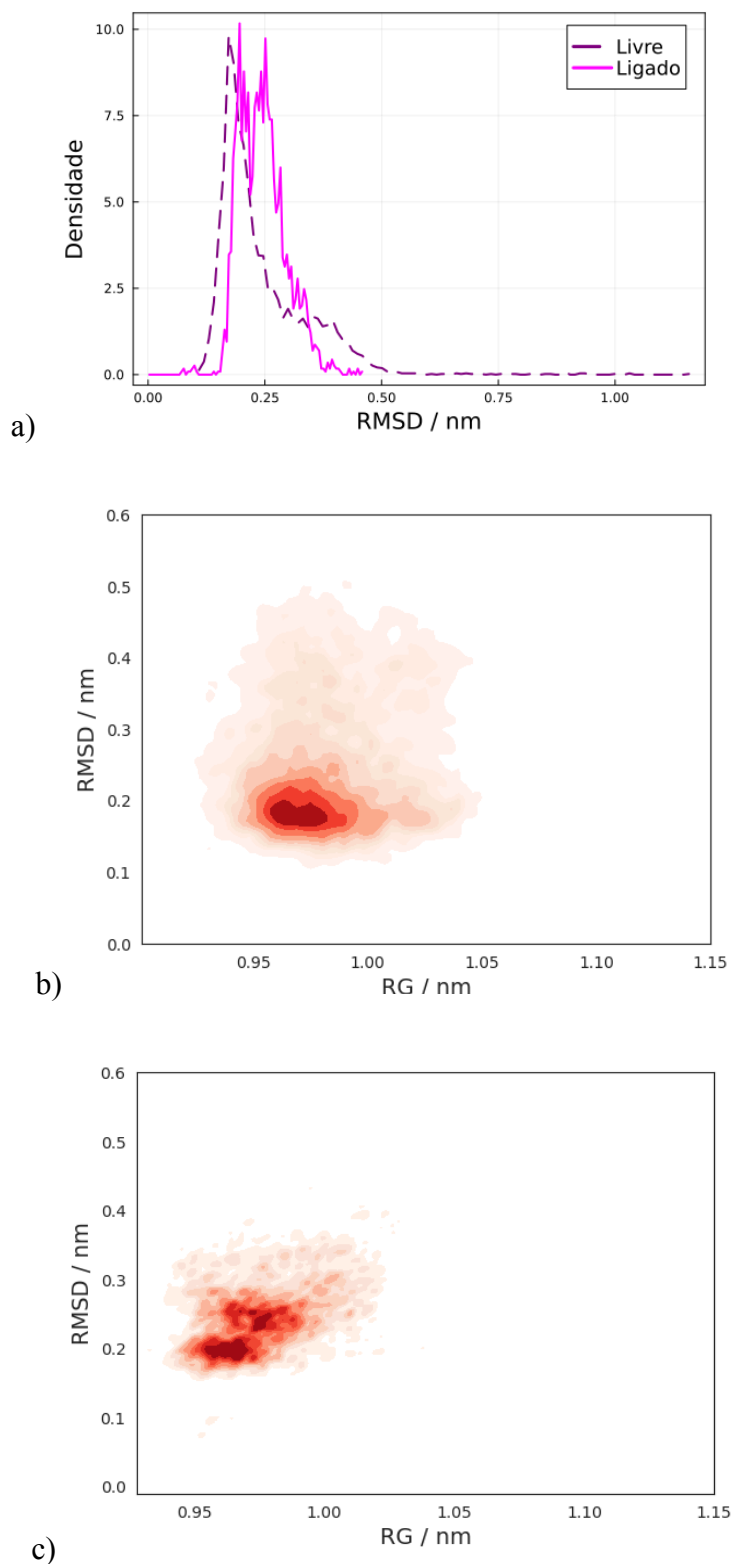


Figura 5.2 (a) Densidade de probabilidade do RMSD do epítipo livre (azul claro) e ligado (azul escuro); e densidades de RMSD em função da densidade do RG para o epítipo (b) livre e (c) ligado.

As Figuras 5.2b e 5.2c mostram a evolução da dinâmica conformacional baseada nas variações de RMSD em função do RG. Embora, no epítipo livre, estruturas com RMSDs próximos à pose cristalográfica tenham sido amostradas com frequência, outras regiões do espaço conformacional também foram acessadas. A variabilidade do epítipo ligado foi menor, tendo amostrado predominantemente dois conjuntos conformacionais centrados em RMSDs de 0.2 nm e 0.3 nm (Figura 5.2c).

A Figura 5.3 mostra o RMSD e RMSF obtidos com o programa MDLovoFit. Nas estruturas representadas, as regiões de maior mobilidade proteica são indicadas em vermelho. Na Figura 5.3a é possível observar que 60% dos resíduos do epítipo livre podem ser sobrepostos com desvios menores que 0.1 nm (1 Å), enquanto no estado ligado (Figura 5.3b), o percentual sobe pra 80% dos resíduos alinhados, mostrando que houve aumento da estruturação do epítipo com a complexação. As regiões de maior mobilidade no epítipo em estado livre (Figura 5.3c) são três, sendo uma correspondente às IDRs da AMA1. Desta forma, é possível observar que no estado ligado (Figura 5.3d), duas regiões da IDR foram estabilizadas com a presença do anticorpo, os resíduos de Lys489 a Pro494, que fazem interação direta no complexo, e a região de alça próximo a C-terminal, que corresponde aos resíduos de Ile479 a Leu488.

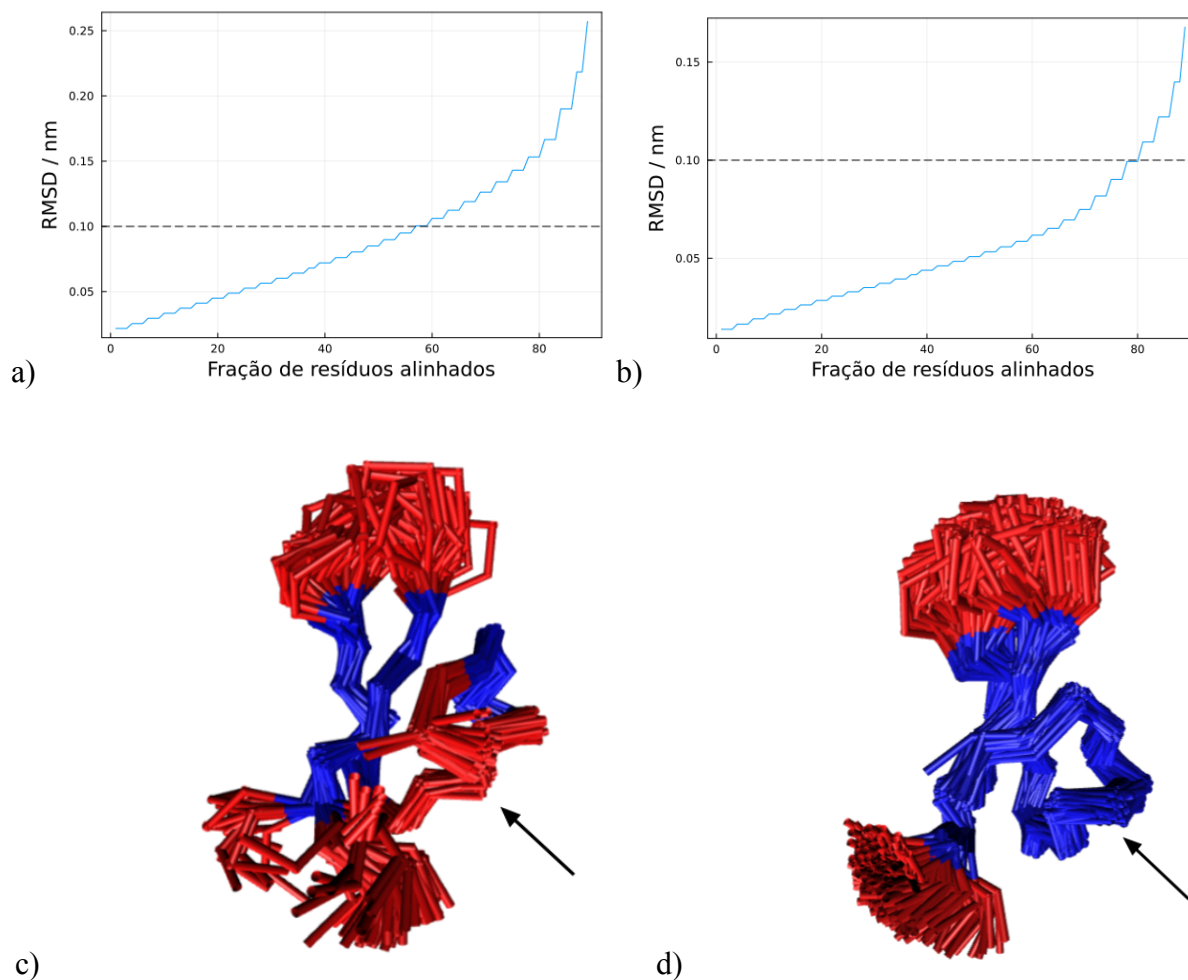


Figura 5.3 Frações de resíduos alinhados no epítipo (a) livre e (b) ligado e as respectivas contribuições dos subconjuntos estruturais para o epítipo (c) livre e (d) ligado. IDRs em vermelho e região de interação com anticorpo indicada pela seta.

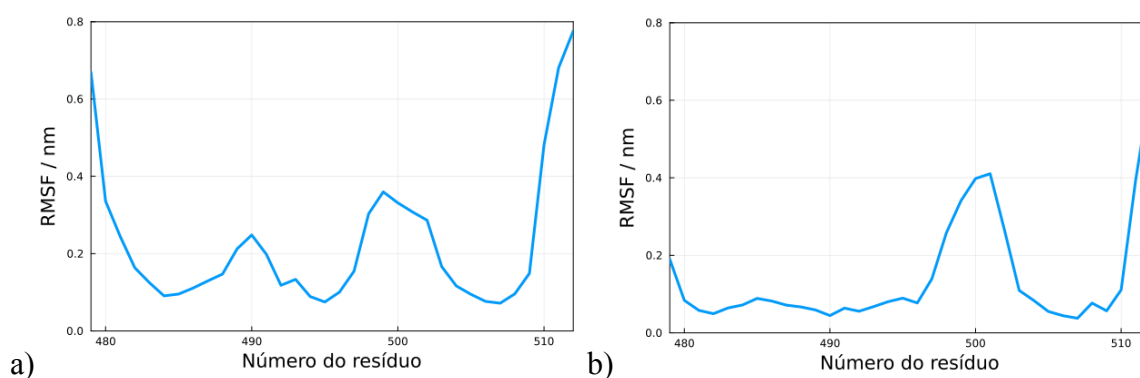


Figura 5.4 RMSF para o epítipo (a) livre e (b) ligado.

Os RMSFs em que são indicadas a contribuição de cada resíduo para a flutuação do epítopo, mostrados na Figura 5.4, corroboram a estruturação de toda a região de resíduos 479 a 488, que inclui a α -hélice, e a região 489 a 494 de interação com o anticorpo. A maior mobilidade nos dois estados está relacionada com as regiões terminais e de *loop* separando as estruturas secundárias em fita- β , embora a estrutura livre se mostre mais flexível que a estrutura ligada (Figura 5.4a).

Ainda é possível comparar essas regiões flexíveis com o fator-B da estrutura cristalográfica. Também chamado de fator de temperatura ou de deslocamento atômico, este parâmetro está relacionado com a flexibilidade ou rigidez de átomos e cadeias, baseadas na atenuação de raios-X causada pelo movimento térmico (Sun et al., 2019). Os resultados observados para o epítopo são consistentes com o gráfico do fator-B (Figura 5.5) em que temos a região de interação com o anticorpo, próximo ao resíduo de 490, bem descrita e mais estruturada que as demais regiões, e o pico mais predominante que corresponde à alça próximo à região terminal que se mantém flexível nos dois estados observados.

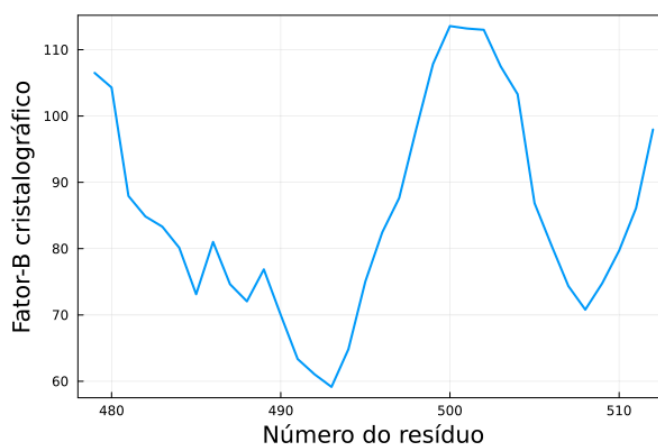


Figura 5.5 Fator-B do epítopo na estrutura cristalográfica PDB id. 2J5L.

Na Figura 5.6 há a densidade de valores de RMSD da região que realiza interação com o anticorpo (Lys489-Pro494) para o epítopo em ambos os sistemas. No complexo, uma distribuição mais concentrada e que não difere muito da pose cristalográfica é observada, enquanto que para o epítopo livre há valores mais dispersos, acessando regiões até maiores de 0.2 nm. Isto reforça as observações acima de que a interação com o anticorpo proporcionou uma estruturação desta região no complexo.

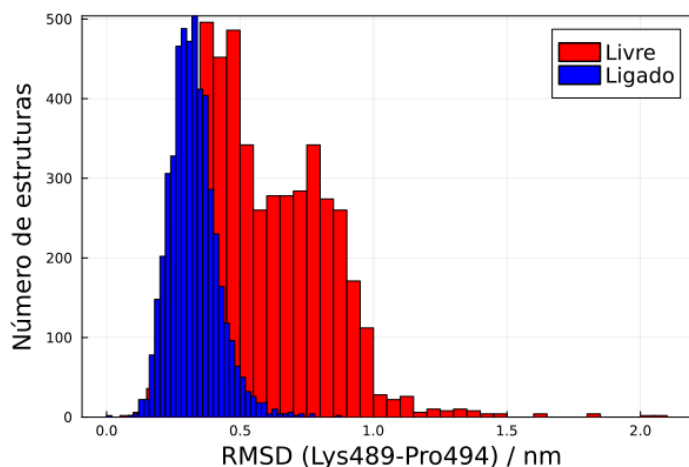


Figura 5.6 Histograma do RMSD da região Lys489-Pro494 do epítipo que realiza interação direta com o anticorpo. Em azul está apresentado o RMSD do epítipo em complexo e, em vermelho, o do epítipo livre.

5.2.1.1 Estrutura terciária

A região dos resíduos Ile479 a Leu488 corresponde a uma α -hélice próxima à região C-terminal na estrutura cristalográfica, como mostra a Figura 5.10a. Esta região apresentou uma estruturação na presença do anticorpo. A Figura 5.7 mostra a densidade da diferença dos valores de RMSD desses resíduos no estado ligado e no estado livre em relação à estrutura cristalográfica. Pode-se observar os valores de 0.4 nm a 0.7 nm presentes no estado livre, em vermelho, indicando estruturas em que apenas essa região apresenta conformações mais dissimilares.

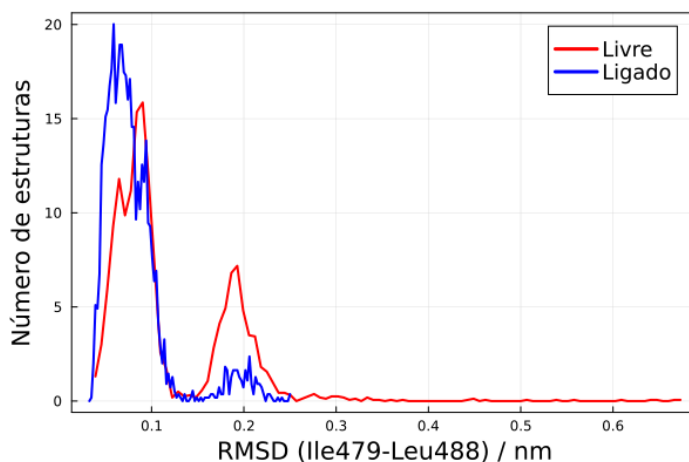


Figura 5.7 Diferença dos RMSDs da região de α -hélice dos estados ligado e livre em relação a estrutura cristalográfica.

A distância entre os átomos das estruturas secundárias também auxilia na compreensão do empacotamento da estrutura terciária do epítipo. A Figura 5.8 mostra as distâncias assumidas entre as duas folhas- β (Figura 5.8a) no gráfico das distâncias ao longo da trajetória (Figura 5.8b). Observa-se que nos dois estados, as duas folhas- β permanecem muito próximas, exceto quando o epítipo no estado livre assume as conformações desordenadas.

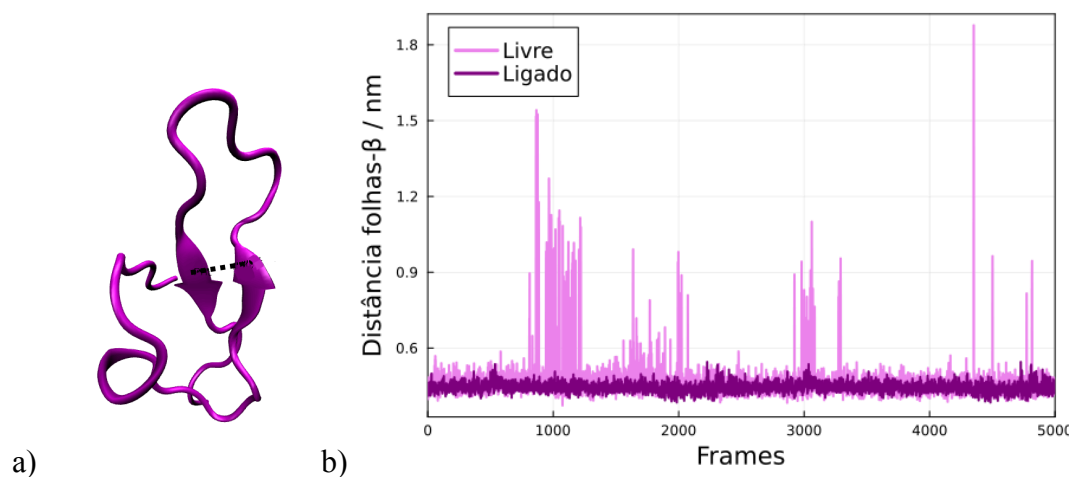


Figura 5.8 Distância entre as estruturas secundárias em (a) folhas- β e (b) gráfico das distâncias ao longo da trajetória nos estados livre (rosa) e ligado (roxo).

Nas Figuras 5.9 temos a distância das folha- β e a α -hélice considerada (Figura 5.9a), e suas posições nos estados livre e ligado, respectivamente. Nas Figuras 5.9b e 5.9c é possível

observar o distanciamento ou aproximação da estrutura de α -hélice em relação às estruturas de folha- β , em que há um desdobramento desta estrutura em porções menores do espaço no epítipo livre, enquanto ela se mantém estabilizada próxima às folhas- β em toda a trajetória no estado ligado. Isto corrobora os resultados anteriores que indicam uma estabilização nesta região na presença do anticorpo e a contribuição da região de Ile479 a Leu488 para as estruturas desordenadas observadas na trajetória não complexada.

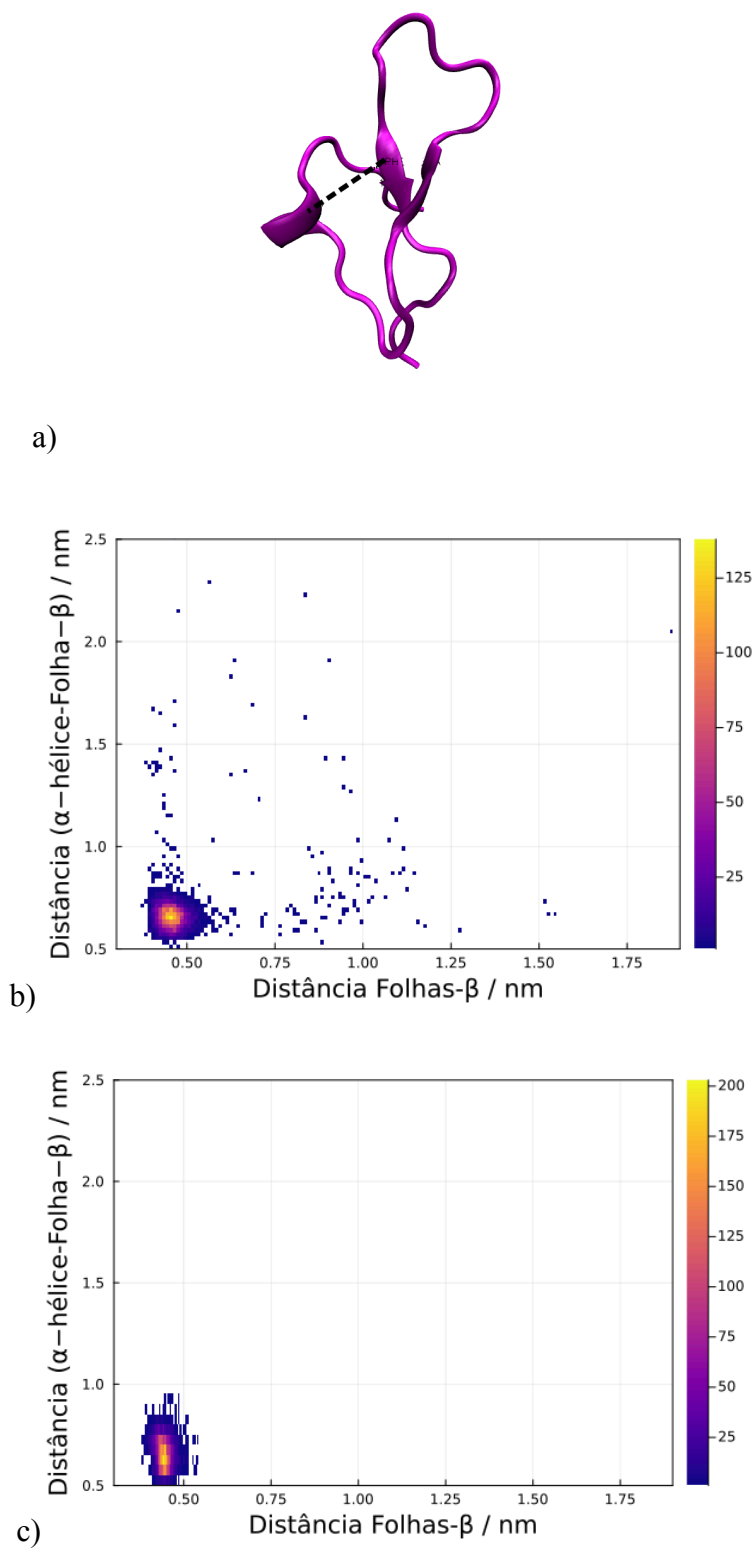


Figura 5.9 (a) Distância assumida entre átomos das estruturas secundárias em folha- β e α -hélice e concentração dessas distâncias no epítipo (b) livre e (c) ligado.

Estas observações são importantes, pois podem indicar que embora a α -hélice seja uma estrutura secundária presente no estado livre em que o epítopo possui mais mobilidade, ela não era uma região totalmente estabilizada. O fenômeno de dobramento após a ligação (*folding upon binding*) é uma característica conhecida em regiões desordenadas (Robustelli et al., 2020), significando que o ambiente da proteína parceira contribuiu para a estabilização da estrutura secundária em α -hélice, que por sua vez, participa intimamente da estruturação da conformação terciária do epítopo.

Como observado no estudo de (Coley et al., 2001), a indução de respostas imunes pela PfAMA1 está relacionada à formação das pontes dissulfetos intermoleculares que estabilizam epítopos conformacionais. Esta característica foi bem descrita na DM, uma vez que embora o epítopo tenha um conjunto razoável de conformações em estado livre e esteja presente em uma região desordenada da AMA1, a presença de pontes dissulfeto e das estruturas secundárias mostram-se mais determinantes para sua função do que as regiões de alta flexibilidade, que só foram acessadas em estado livre.

5.2.2 Conjuntos conformacionais

As conformações ao longo da trajetória podem ser clusterizadas para observação da similaridade entre as estruturas. A partir da análise de HCA de similaridade das estruturas pelo RMSD (Figura 5.10), podemos observar que há quatro grandes conjuntos estruturais mais dissimilares entre si. O cluster vermelho corresponde às estruturas mais populadas da simulação, nas quais o epítopo permanece ordenado. Ainda há estados metaestáveis, correspondentes aos clusters verde e azul, e em determinados pontos da trajetória, o epítopo acessa conformações completamente desordenadas (amarelo). Na Figura 5.11 há a comparação das estruturas bases dos clusters para o epítopo do estado livre. O cluster amarelo de 21 estruturas corresponde às estruturas de maior dissimilaridade, completamente desdobradas e pouco prováveis.

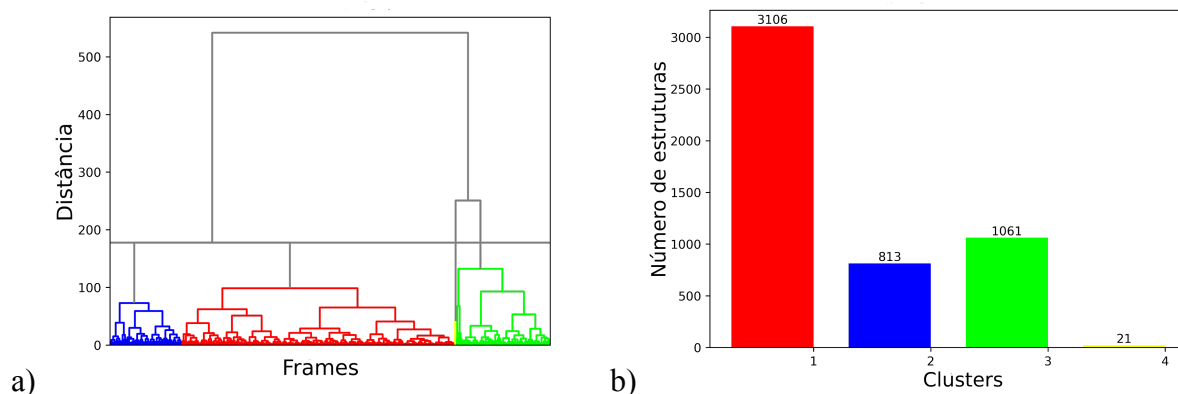


Figura 5.10 Clusterização das estruturas obtidas na trajetória do epítipo livre por (a) dendrograma e (b) quantidade de estruturas por cluster.

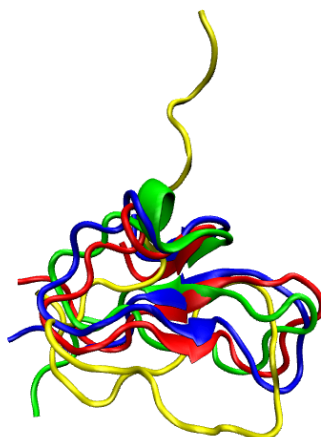
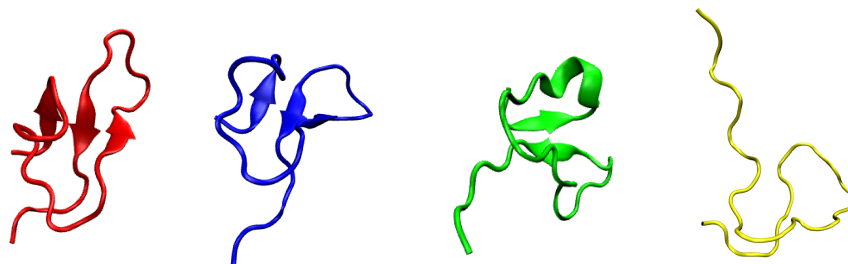


Figura 5.11 Alinhamento das estruturas base dos quatro grupos de clusters para o epítipo livre.

No estado livre, dentre as 5001 conformações, 1082 são estruturas parcialmente ou totalmente desordenadas mais representadas pelos clusters verde e amarelo. Na Figura 5.12, temos os RMSDs das estruturas mais representativas dos clusters em relação à estrutura cristalográfica.



| | | | | |
|------------------|------|------|------|------|
| RMSD / nm | 0.21 | 0.29 | 0.47 | 0.85 |
|------------------|------|------|------|------|

Figura 5.12 RMSDs das estruturas bases dos clusters em relação à estrutura cristalográfica.

A clusterização da trajetória do epítipo no estado ligado pode passar a impressão, em um primeiro momento, de que há uma maior variabilidade conformacional (Figura 5.13), no entanto, as estruturas bases de cada cluster (Figura 5.14) confirmam que o que estamos observando são pequenas variações próximas à estrutura cristalográfica que, de maneira geral, também corresponde ao cluster vermelho mais populado do epítipo em estado livre na Figura 5.10b. Estas informações aliadas às análises de densidade do RMSD nos dois estados indicam que o anticorpo realizou interação com uma conformação pré-existente no estado não complexado, e que após isso, a presença da proteína parceira contribuiu para aumentar a estruturação do epítipo conformacional da *PfAMA1*. A estabilidade do conjunto de conformações em regiões próximas a uma pose ativa (neste caso, a conformação cristalográfica) foi discutida por autores (Dogan et al., 2014) como indício de ajuste conformacional no estado antes da interação.

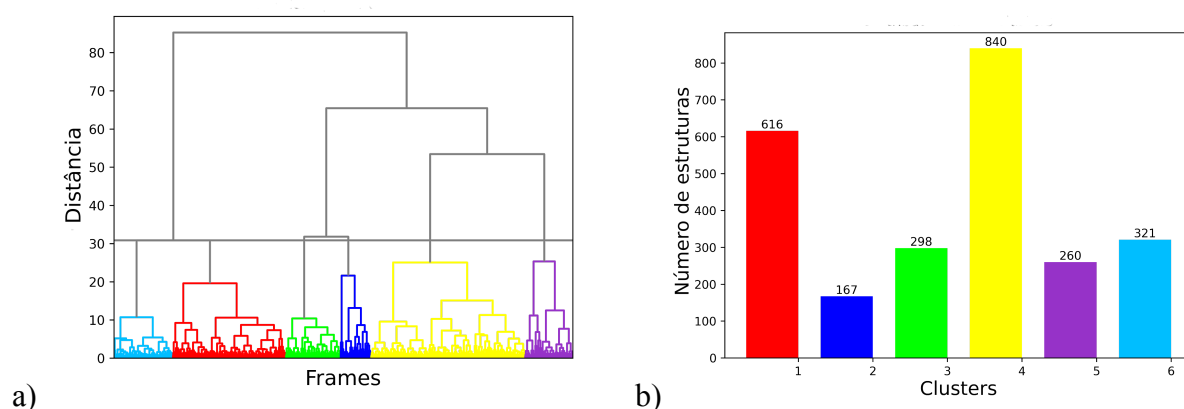


Figura 5.13 Clusterização das estruturas obtidas na trajetória do epítipo ligado por (a) dendrograma e (b) quantidade de estruturas por clusters.



Figura 5.14 Alinhamento das estruturas base dos seis grupos de clusters do epítipo ligado.

Os RMSDs desses clusters em relação à estrutura cristalográfica tem mínimo de 0.1 nm e máximo de 0.26 nm, corroborando a similaridade dos RMSDs já calculados em relação à estrutura cristalográfica.

Aliar o RMSD à SASA permite uma visualização multidimensional da flexibilidade proteica, que tem sido associada à antigenicidade de epítipos (Dogan et al., 2014). Assumindo-se o valor relativo de SASA (Srel), no epítipo livre, estruturas com $Srel \leq 1.05$ foram consideradas ordenadas, e estruturas > 1.1 como desordenadas ou metaestáveis (Figura 5.15a e Figura 5.16a). O epítipo no estado ligado apresenta uma área de superfície mais compacta, comumente observada em epítipos conformacionais, não apresentando nenhum valor acima de 1.1 (MacRaild et al., 2016). A Figura 5.15 mostra a magnitude da mudança

conformacional da proteína nos dois estados. O epítipo livre (Figura 5.15a) apresenta conjuntos conformacionais desordenados com altos RMSDs e Srel. Também mostra um conjunto mais concentrado em RMSDs próximos a 0.5 nm e Srel \approx 1.1 que são estruturas parcialmente desestruturadas, e os valores mais concentrados em estruturas compactas e com menor área de superfície na região azul escuro de RMSD \approx 0.2 nm.

Pode-se dizer que o epítipo ligado (Figura 5.15b e Figura 5.16b) apresenta um conjunto de estruturas deslocado para regiões próximas à pose cristalográfica. Isto sugere a relevância funcional do conjunto próximo às estruturas mais compactas, com menores valores de Srel e RMSD. Isto também é observado no histograma de Srel do epítipo livre, em que os valores estão concentrados na região de 0.9 a 1.1.

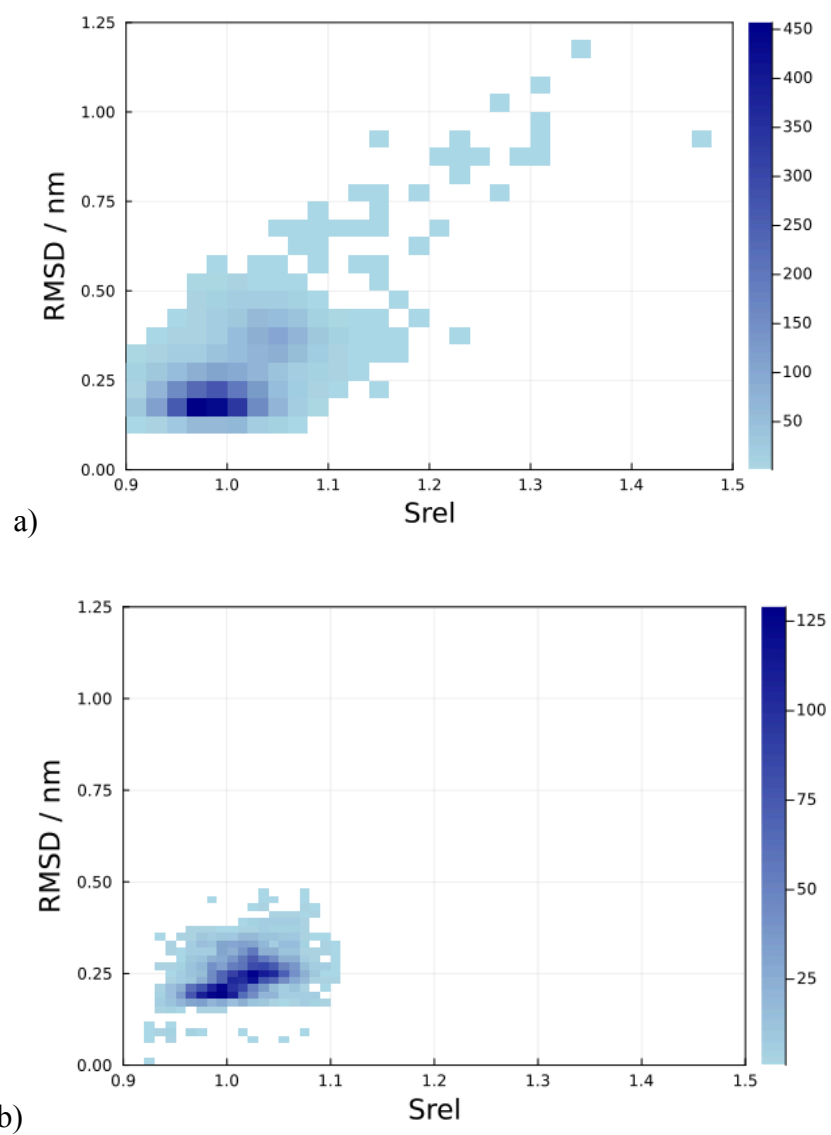


Figura 5.15 Densidade de RMSD em função da densidade de Srel nos estados (a) livre e (b) ligado.

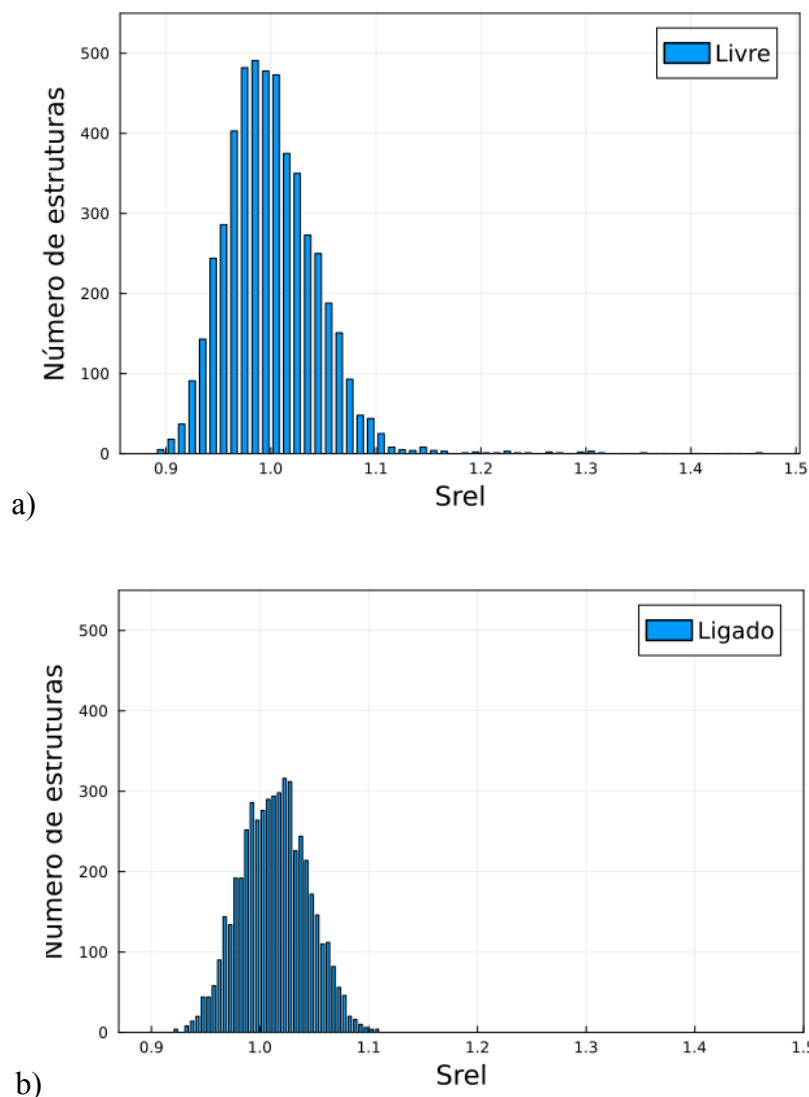


Figura 5.16 Srel obtidos nos estados (a) livre e (b) ligado.

Estas análises do epítipo nos dois estados mostram que a interação com o anticorpo foi realizada com uma conformação presente no estado livre e que era a mais populada dentre as conformações possíveis. Dentre as conformações dinâmicas da proteína flexível, é selecionada a conformação compatível ao ligante e todo o conjunto conformacional é deslocado para este estado, favorecendo a estabilização da estrutura secundária do sítio de interação.

A seleção conformacional foi, portanto, o fenômeno observado com a diminuição das variações de RMSD e Srel, e a estabilização de estruturas secundárias e de IDR, esta última que realiza interação direta no parótopo do anticorpo. Estas observações condizem com a

relevância funcional do epítipo conformacional da *Pf*AMA1 na literatura (Nair et al., 2002) (Chakraborty & Di Cera, 2017; Dogan et al., 2014).

5.2.3 Interações intermoleculares e CDRs

O parótopo do anticorpo (Figura 5.17) é formado pelas CDR-H1 localizada em 25-SER a 37-VAL, CDR-H2 localizada em 53-GLY a 61-ASP e CDR-H3 na região 95-ASP a 102-TYR, identificadas em vermelho, ciano e laranja. Também as CDR-L1 localizada em 31-SER a 37-GLN, CDR-L2 na região 49-HIS a 58-VAL e, por fim, CDR-L3 de localização 88-CYS a 97-THR, identificadas em amarelo, verde e azul, respectivamente.

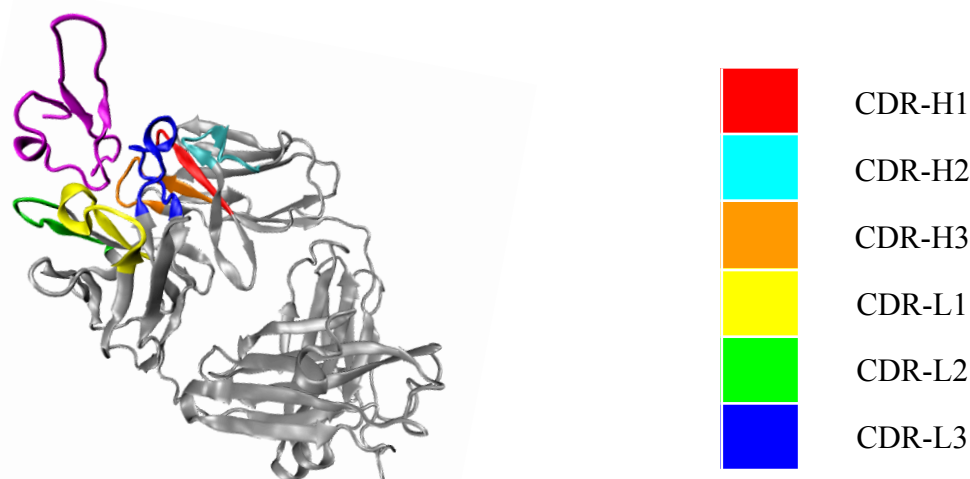


Figura 5.17 Regiões Determinantes de Complementariedade anticorpo Fab F8.12.19 de cadeia pesada (H1, H2 e H3) e cadeia leve (L1, L2 e L3). O epítipo está representado em magenta.

O anticorpo Fab F8.12.19 foi sintetizado para realizar interação com a AMA1 da espécie *Plasmodium vivax* (*Pv*AMA1), mas também realizou interação cruzada com a espécie do *Pf*. A Tabela 5.2 mostra as ligações de Hidrogênio indicadas nas estruturas cristalográficas. Na notação para o anticorpo, após a abreviação do resíduo, as cadeias pesadas e leves são identificadas por “H” e “L”, respectivamente. De fato, há mais interações entre o anticorpo e a proteína *Pv*AMA1, mas ainda são indicadas sete ligações de Hidrogênio

e uma ponte salina, Lys485-Asp(H52), entre o anticorpo e o epítipo da *Pf*AMA1. Os átomos que realizam contatos são mostrados em parênteses.

Tabela 5.2 Interações polares antígeno-anticorpo no complexo *Pf*AMA1 e Fab F8.12.19 (Igonet et al., 2007).

| PvAMA1 | PfAMA1 | Antibody |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Lys427(N ^ε) | Lys485(N ^ε) | Asp-H31(O) |
| Lys427(N ^ε) | Lys485(N ^ε) | Asp-H52(O ^{δ2}) |
| Glu428(O^{ε1}) | – | Asn-H54(N) |
| Glu428(O^{ε2}) | – | Asn-H54(N ^{δ2}) |
| Cys432(O) | Cys490(O) | Tyr-H33(OH) |
| Cys432(O) | Cys490(O) | Tyr-H58(OH) |
| Glu435(N) | Asp493(N) | Tyr-H35(OH) |
| Glu435(O^{ε1}) | Asp493(O^{δ1}) | Tyr-H33(N) |
| Glu437(O ^{ε1}) | Glu495(O ^{δ2}) | Tyr-H100C(OH) |
| Asn450(N^{δ2}) | – | Gly-H100B(O) |
| Val452(N) | – | Ser-L92(O) |
| Val452(O) | Val510(O) | His-L94(N) |

Através da DM, é possível identificar as interações que se mostraram importantes para a estabilidade do complexo. As Figuras 5.18 e 5.19 mostram que as CDRs que tiveram contribuições mais significativas para a interação com o epítipo foram as CDR-H1, CDR-H2 e CDR-L3. Dentre as interações observadas na pose cristalográfica, Tyr(H33)-Asp493, Tyr(H35)-Asp493 e His(L94)-Val510 são as observadas em maiores proporções e que se mantêm estabilizadas ao longo da trajetória. Outra observação importante é que algumas interações realizadas pelo anticorpo apenas com a espécie *Pv*AMA1, foram observadas na simulação com o epítipo da *Pf*AMA1, apesar de em menores contribuições: Asn(H54)-Asp486 e Ser(L92)-Arg512. Ser(L93)-Glu511 e Tyr(H56)-Asp485 são interações que não foram reportadas na Tabela 5.2, mas possuem razoáveis contribuições no complexo.

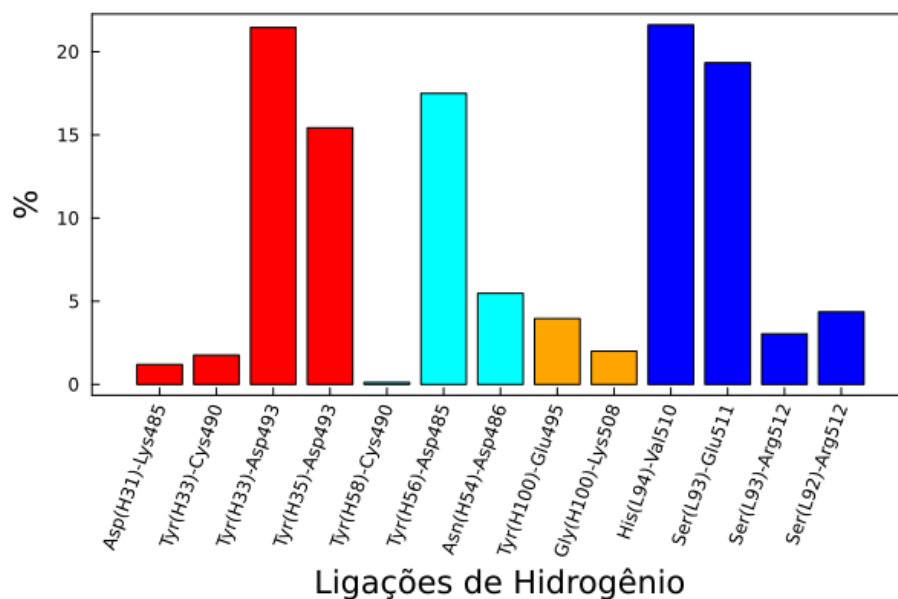


Figura 5.18 Percentual de conformações das simulações em que ligações de Hidrogênio entre o epítipo e as CDRs são observadas. H1 em vermelho, H2 em ciano, H3 em laranja e L3 em azul.

Na Figura 5.19 temos as ligações de Hidrogênio realizadas pelas CDRs ao longo da DM. Como já indicado nas observações anteriores, observa-se que as CDRs de cadeia pesada estão mais relacionadas com a estabilidade e formação de interações, tendo de duas a três ligações de Hidrogênio em cada frame da trajetória, enquanto as CDRs-L2 e L3 não realizam interações significativas.

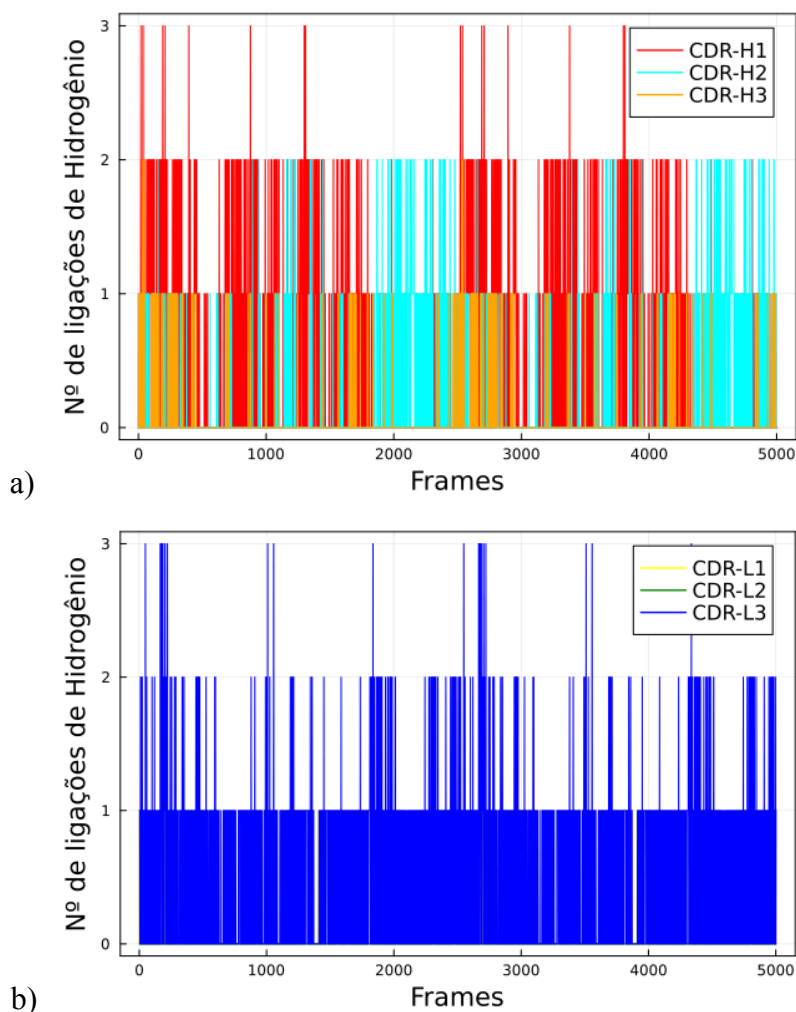


Figura 5.19 Quantidade de ligações de Hidrogênio realizadas pelas CDRs de (a) cadeia pesada e de (b) cadeia leve em cada frame.

O anticorpo é uma estrutura rígida (Figura 5.20) que realiza interações específicas. Na DM, de maneira geral, não observamos grandes modificações na estrutura global do estado ligado em relação ao estado livre. Esta flexibilidade conformacional reduzida no parótopo do Fab F8.12.19, também é observada em estudos experimentais e computacionais para outros anticorpos (Jeliazkov et al., 2018). A rigidez observada tem a finalidade de evitar perdas entrópicas durante a interação com o antígeno e fornecer uma tridimensionalidade precisa para apresentação de contatos-chave, permitindo assim, uma associação rápida (Lawson et al., 2018).

As CDRs têm papel fundamental na especificidade dos anticorpos e reconhecimento dos antígenos. Dentre os 6 *loops* que formam o parótopo, 5 adotam conformações canônicas

que são bem caracterizadas e facilitam trabalhos computacionais como de modelagem e predição (Fernández-Quintero et al., 2018). No entanto, diversos estudos mostram que a CDR-H3 é uma exceção a esta aparente rigidez no parótopo, pois esta alça apresenta maior variabilidade estrutural e conformacional a essas conformações variáveis, mesmo em comparação com diferentes organismos, podendo contribuir para o aumento de contatos (Fernández-Quintero et al., 2019; Yamashita, 2018).

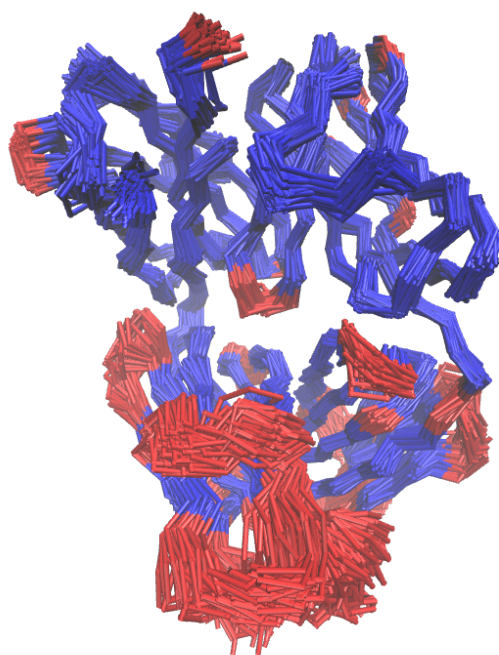
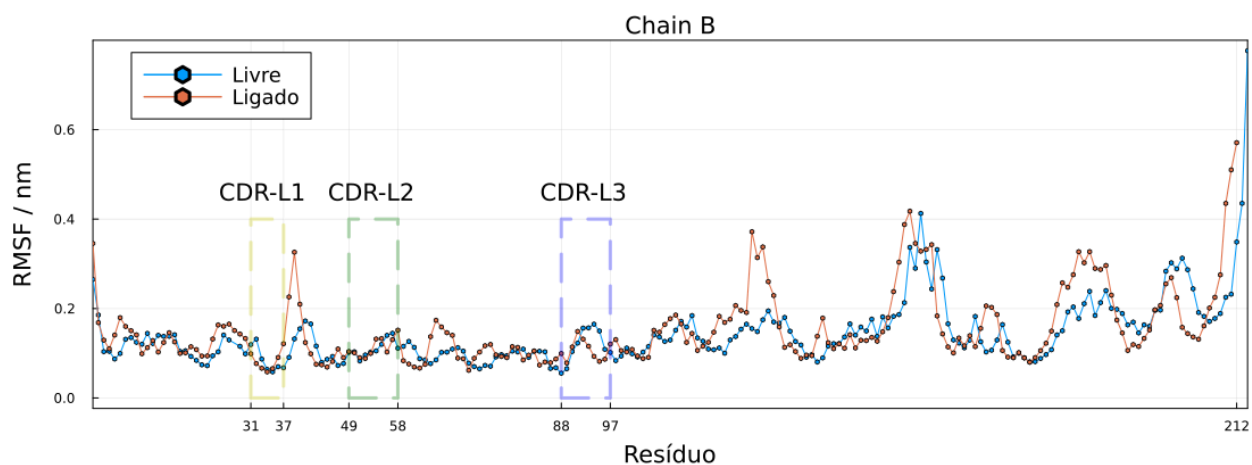


Figura 5.20 Regiões pouco flexíveis no parótopo do anticorpo em azul segundo classificação do *software* MDLovoFit.

Os RMSFs (Figura 5.21) mostram que estas características foram bem descritas na DM, uma vez que não há grandes flutuações nas regiões das CDRs. Somente a CDR-H3 mostrou plasticidade mais apreciável com a diminuição do RMSF na presença do epítipo no estado ligado (Figura 5.21b).

a)



b)

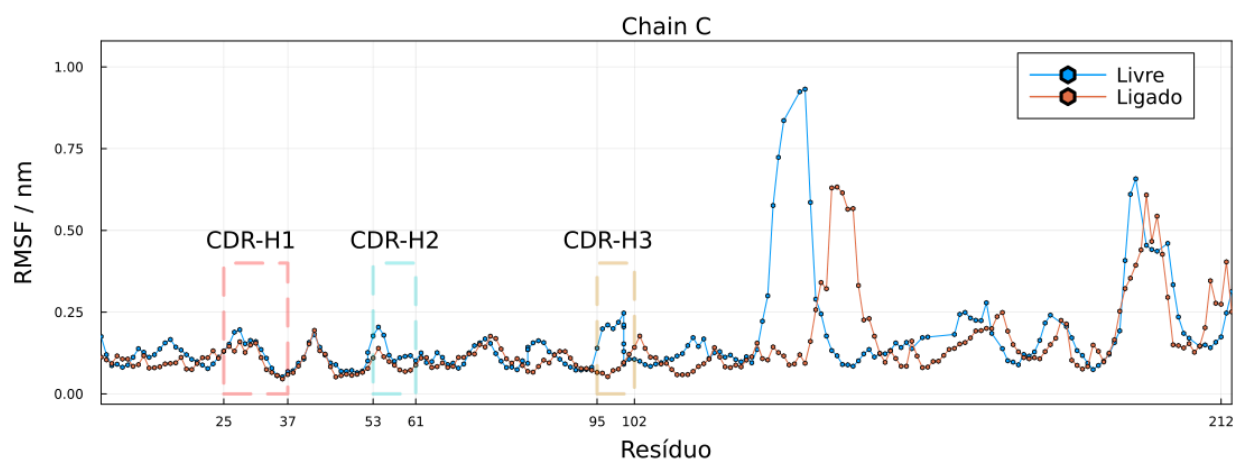


Figura 5.21 Gráficos de RMSF das cadeias (a) leve e (b) pesada do anticorpo livre em azul claro e ligado em laranja.

O estudo de (Jeliazkov et al., 2018) sugere que a rigidez no parótopo pode ser um mecanismo de aumento da afinidade, e que somente as CDR-H3 em diferentes anticorpos permanecem com diferenças entre os valores de RMSDs acima de 0.1 nm. Isto também foi observado na DM do anticorpo Fab F8.12.19 no presente estudo (Figura 5.22a). A diferença dos maiores RMSDs entre o estado livre e ligado das demais CDRs manteve-se próxima ou pouco acima de 0.05 nm, indicando pouca flexibilidade nessas estruturas canônicas. O gráfico de densidade de RMSD da CDR-H3 (Figura 5.22b) mostra a dispersão mais expressiva desta alça na ausência do epítipo, até 0.4 nm em relação à estrutura cristalográfica, e que foi reduzida e estabilizada com a interação.

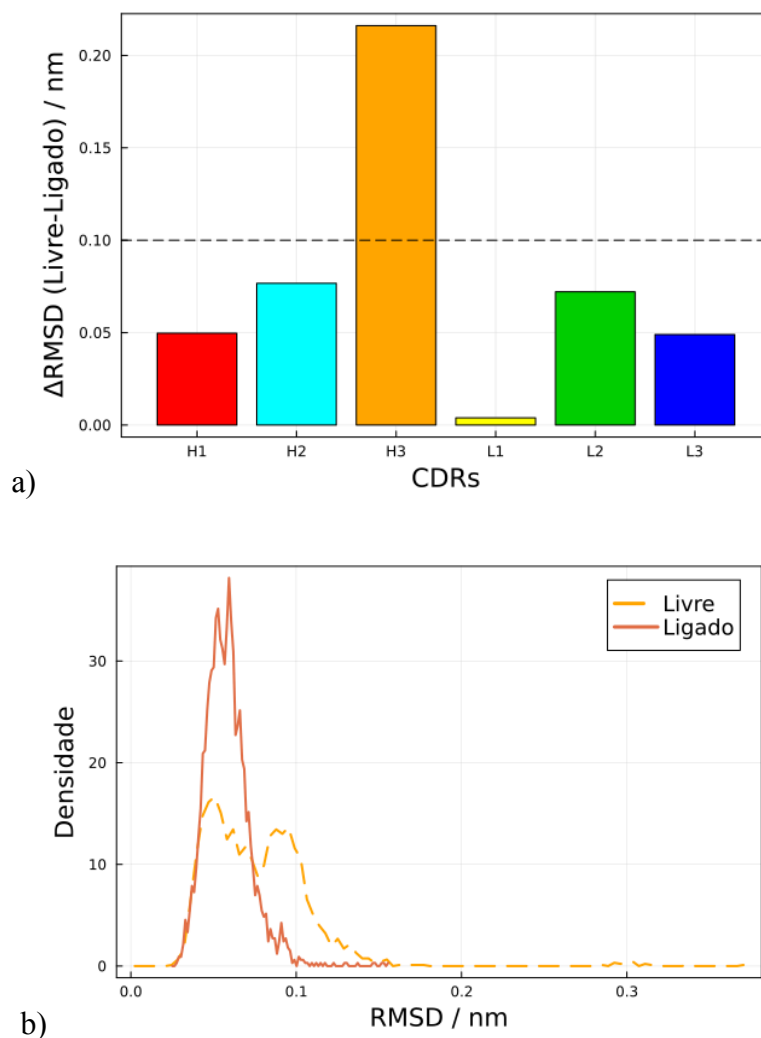


Figura 5.22 (a) Diferenças dos maiores RMSDs entre os estados livre e ligado nas CDRs do anticorpo Fab F8.12.19 e (b) densidade dos RMSDs nos dois estados da CDR-H3.

A importância do papel desempenhado e o motivo que leva a este comportamento diferenciado neste *loop* em específico ainda é objeto de discussão (Kuroda & Tsumoto, 2023; Persson et al., 2013). A rigidez do parótopo em diferentes estados, como mostrada por (Jeliazkov et al., 2018) também não é uma característica definitiva, uma vez que não pode-se afirmar que ainda há uma amostragem satisfatória de parótopos de anticorpos em estudos experimentais e teóricos.

No mecanismo de seleção conformacional estendida observado entre o epítipo da PfAMA1 e o anticorpo monoclonal Fab F8.12.19, pode-se compreender que além da seleção da conformação do epítipo já existente em estado livre, este induz um pequeno ajuste na

estrutura do anticorpo predominantemente na CDR-H3. O epítipo apresenta uma variabilidade conformacional reduzida quando em interação com o anticorpo, que além de sua rigidez característica, estabiliza o complexo com ligações de Hidrogênio. O epítipo funcional é estruturado, compacto, e seu conjunto conformacional complexado tem estruturas próximas dinamicamente à pose cristalográfica, corroborando a relevância funcional desta conformação.

CAPÍTULO 6

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do método de DM com amostragem ampliada foi possível estudar a dinâmica do epítipo de *Pf*AMA livre em solução e associado ao anticorpo Fab F8.12.19. O epítipo da *Pf*AMA1 em estado livre acessa conformações parcialmente e totalmente desestruturadas, embora tenha apresentado uma maior população de conformações similares à conformação cristalográfica. Este conjunto foi selecionado e estabilizado pela complexação com o anticorpo.

Foi possível observar que a região de resíduos Ile479 a Leu488 têm grande contribuição na mobilidade do epítipo. A estrutura em α -hélice nesta região é desestabilizada quando o epítipo assume conformações parcialmente ou totalmente desordenadas. Cerca de 20% do epítipo sofre estabilização quando este se associa ao anticorpo. Fundamentalmente, uma das regiões estabilizadas apresenta desordem no epítipo livre, e é a região principal de interação com o parótopo. Embora o sítio de interação do anticorpo seja formado por regiões de alças, as chamadas CDRs, elas possuem um comportamento bem estruturado, e uma maior variabilidade conformacional foi observada somente na CDR-H3. Fato que é confirmado por outros estudos.

As ligações de Hidrogênio mais importantes observadas foram: Tyr(H33)-Asp493, Tyr(H35)-Asp493 e His(L94)-Val510 realizadas pelas CDR-H1, CDR-H2 e CDR-L3. Também foi possível observar interações que foram reportadas somente com a espécie *Plasmodium vivax* na DM deste complexo com o *Pf*: Asn(H54)-Asp486 e Ser(L92)-Arg512. Outras interações que são frequentemente observadas no complexo, na dinâmica molecular, mas não aparecem na pose cristalográfica: Ser(L93)-Glu511 e Tyr(H56)-Asp485.

Os métodos computacionais são grandes aliados aos métodos experimentais para compreender fenômenos em nível molecular. Pode-se afirmar que o método de HREMD foi robusto para descrever o mecanismo de interação de seleção conformacional estendida entre o epítipo *Pf*AMA1 e o anticorpo monoclonal Fab F8.12.19. Foi possível caracterizar

interações importantes e compreender a variabilidade conformacional das moléculas na presença ou ausência de suas proteínas parceiras. O estudo da interação antígeno-anticorpo é importante devido a necessidade de compreender a estabilidade, especificidade e antigenicidade das proteínas e regiões de desordem do *Plasmodium falciparum* para o desenvolvimento de tratamentos antimaláricos efetivos.

REFERÊNCIAS

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, 19–25.
- Alanine, D. G. W., Quinkert, D., Kumarasingha, R., Mehmood, S., Donnellan, F. R., Minkah, N. K., Dadonaite, B., Diouf, A., Galaway, F., Silk, S. E., Jamwal, A., Marshall, J. M., Miura, K., Foquet, L., Elias, S. C., Labbé, G. M., Douglas, A. D., Jin, J., Payne, R. O., ... Draper, S. J. (2019). Human Antibodies that Slow Erythrocyte Invasion Potentiate Malaria-Neutralizing Antibodies. *Cell*, 178(1), 216–228.e21.
- Albuquerque, A. de O., da Silva Junior, H. C., Sartori, G. R., & Martins da Silva, J. H. (2022). Computationally-obtained structural insights into the molecular interactions between Pidilizumab and binding partners DLL1 and PD-1. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 40(14), 6450–6462.
- Almeida, M. E. M. de, Vasconcelos, M. G. S. de, Tarragô, A. M., & Mariúba, L. A. M. (2021). Circumsporozoite Surface Protein-based malaria vaccines: a review. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 63, e11.
- Andreani, R., Martínez, J. M., Martínez, L., & Yano, F. (2008). Continuous optimization methods for structure alignments. *Mathematical Programming. A Publication of the Mathematical Programming Society*, 112(1), 93–124.
- Beaudoin, C. A., Jamasb, A. R., Alsulami, A. F., Copoiu, L., van Tonder, A. J., Hala, S., Bannerman, B. P., Thomas, S. E., Vedithi, S. C., Torres, P. H. M., & Blundell, T. L. (2021). Predicted structural mimicry of spike receptor-binding motifs from highly pathogenic human coronaviruses. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 3938–3953.
- Beeson, J. G., Kurtovic, L., Dobaño, C., Opi, D. H., Chan, J.-A., Feng, G., Good, M. F., Reiling, L., & Boyle, M. J. (2019). Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting malaria vaccines. *Science Translational Medicine*, 11(474). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau1458>
- Bemani, P., Amirghofran, Z., & Mohammadi, M. (2020). Designing a multi-epitope vaccine against blood-stage of Plasmodium falciparum by in silico approaches. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 99, 107645.
- Bernardi, R. C., Melo, M. C. R., & Schulten, K. (2015). Enhanced sampling techniques in

- molecular dynamics simulations of biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850(5), 872–877.
- Bernetti, M., Masetti, M., Pietrucci, F., Blackledge, M., Jensen, M. R., Recanatini, M., Mollica, L., & Cavalli, A. (2017). Structural and Kinetic Characterization of the Intrinsically Disordered Protein SeV NTAIL through Enhanced Sampling Simulations. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 121(41), 9572–9582.
- Best, R. B. (2017). Computational and theoretical advances in studies of intrinsically disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 42, 147–154.
- Best, R. B. (2019). Atomistic Force Fields for Proteins. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 3–19.
- Best, R. B., & Hummer, G. (2009). Optimized Molecular Dynamics Force Fields Applied to the Helix–Coil Transition of Polypeptides. In *The Journal of Physical Chemistry B* (Vol. 113, Issue 26, pp. 9004–9015). <https://doi.org/10.1021/jp901540t>
- Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M., & MacKerell, A. D. (2012). Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. In *Journal of Chemical Theory and Computation* (Vol. 8, Issue 9, pp. 3257–3273). <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
- Beutler, N., Pholcharee, T., Oyen, D., Flores-Garcia, Y., MacGill, R. S., Garcia, E., Calla, J., Parren, M., Yang, L., Volkmuth, W., Locke, E., Regules, J. A., Dutta, S., Emerling, D., Early, A. M., Neafsey, D. E., Winzeler, E. A., King, C. R., Zavala, F., ... Rogers, T. F. (2022). A novel CSP C-terminal epitope targeted by an antibody with protective activity against Plasmodium falciparum. *PLoS Pathogens*, 18(3), e1010409.
- Biorender. (2021). *Created with BioRender. com*.
- Bonomi, M., Branduardi, D., Bussi, G., Camilloni, C., Provasi, D., Raiteri, P., Donadio, D., Marinelli, F., Pietrucci, F., Broglia, R. A., & Parrinello, M. (2009). PLUMED: A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics. *Computer Physics Communications*, 180(10), 1961–1972.
- Borcherds, W., Bremer, A., Borgia, M. B., & Mittag, T. (2021). How do intrinsically disordered protein regions encode a driving force for liquid–liquid phase separation? *Current Opinion in Structural Biology*, 67, 41–50.
- Burki, T. (2022). New declaration on neglected tropical diseases endorsed. *The Lancet*, 400(10345), 15.
- Bussi, G. (2014). Hamiltonian replica exchange in GROMACS: a flexible implementation.

Molecular Physics, 112(3-4), 379–384.

- Campeotto, I., Goldenzweig, A., Davey, J., Barfod, L., Marshall, J. M., Silk, S. E., Wright, K. E., Draper, S. J., Higgins, M. K., & Fleishman, S. J. (2017). One-step design of a stable variant of the malaria invasion protein RH5 for use as a vaccine immunogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(5), 998–1002.
- Case, D. A., Metin Aktulga, H., Belfon, K., Ben-Shalom, I., Brozell, S. R., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E., III, Cruzeiro, V. W. D., Darden, T. A., Duke, R. E., Giambasu, G., Gilson, M. K., Gohlke, H., Goetz, A. W., Harris, R., Izadi, S., Izmailov, S. A., Jin, C., Kasavajhala, K., ... Kollman, P. A. (2021). *Amber 2021*. University of California, San Francisco.
- Chakraborty, P., & Di Cera, E. (2017). Induced Fit Is a Special Case of Conformational Selection. *Biochemistry*, 56(22), 2853–2859.
- Chen, E., Paing, M. M., Salinas, N., Sim, B. K. L., & Tolia, N. H. (2013). Structural and functional basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies that target Plasmodium falciparum EBA-175. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003390.
- Chen, L., Xu, Y., Wong, W., Thompson, J. K., Healer, J., Goddard-Borger, E. D., Lawrence, M. C., & Cowman, A. F. (2017). Structural basis for inhibition of erythrocyte invasion by antibodies to Plasmodium falciparum protein CyRPA. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21347>
- Chen, Y., Xu, K., Piccoli, L., Foglierini, M., Tan, J., Jin, W., Gorman, J., Tsybovsky, Y., Zhang, B., Traore, B., Silacci-Fregni, C., Daubenberger, C., Crompton, P. D., Geiger, R., Sallusto, F., Kwong, P. D., & Lanzavecchia, A. (2021). Structural basis of malaria RIFIN binding by LILRB1-containing antibodies. *Nature*, 592(7855), 639–643.
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., & Tulip, W. R. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342(6252), 877–883.
- Choura, M., & Rebaï, A. (2021). Open questions: Reflections on intrinsically disordered proteins. *Network Biology*, 11(4), 274–276.
- Clerc, I., Sagar, A., Barducci, A., Sibille, N., Bernadó, P., & Cortés, J. (2021). The diversity of molecular interactions involving intrinsically disordered proteins: A molecular

- modeling perspective. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 3817–3828.
- Coelho, C. H., Tang, W. K., Burkhardt, M., Galson, J. D., Muratova, O., Salinas, N. D., Alves E Silva, T. L., Reiter, K., MacDonald, N. J., Nguyen, V., Herrera, R., Shimp, R., Narum, D. L., Byrne-Steele, M., Pan, W., Hou, X., Brown, B., Eisenhower, M., Han, J., ... Duffy, P. E. (2021). A human monoclonal antibody blocks malaria transmission and defines a highly conserved neutralizing epitope on gametes. *Nature Communications*, *12*(1), 1750.
- Coley, A. M., Campanale, N. V., Casey, J. L., Hodder, A. N., Crewther, P. E., Anders, R. F., Tilley, L. M., & Foley, M. (2001). Rapid and precise epitope mapping of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* AMA1 by combined phage display of fragments and random peptides. *Protein Engineering*, *14*(9), 691–698.
- Coley, A. M., Gupta, A., Murphy, V. J., Bai, T., Kim, H., Foley, M., Anders, R. F., & Batchelor, A. H. (2007). Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. *PLoS Pathogens*, *3*(9), 1308–1319.
- Csermely, P., Palotai, R., & Nussinov, R. (2010). Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(10), 539–546.
- Cyster, J. G., & Allen, C. D. C. (2019). B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*, *177*(3), 524–540.
- Darve, E., Rodríguez-Gómez, D., & Pohorille, A. (2008). Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations. *The Journal of Chemical Physics*, *128*(14), 144120.
- Deiana, A., Forcelloni, S., Porrello, A., & Giansanti, A. (2019). Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell. *PloS One*, *14*(8), e0217889.
- Delgadillo, R. F., Parker, M. L., Lebrun, M., Boulanger, M. J., & Douguet, D. (2016). Stability of the *Plasmodium falciparum* AMA1-RON2 Complex Is Governed by the Domain II (DII) Loop. *PloS One*, *11*(1), e0144764.
- De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., Del Portillo, H. A., Spielmann, T., Frischknecht, F., & Heussler, V. T. (2017). Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. *Nature Reviews. Microbiology*, *15*(1), 37–54.
- Dogan, J., Gianni, S., & Jemth, P. (2014). The binding mechanisms of intrinsically disordered proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, *16*(14), 6323–6331.

- Eisenhaber, F., Lijnzaad, P., Argos, P., Sander, C., & Scharf, M. (1995). The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry*, *16*(3), 273–284.
- Escalante, A. A., Grebert, H. M., Chaiyaroj, S. C., Magris, M., Biswas, S., Nahlen, B. L., & Lal, A. A. (2001). Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of *Plasmodium falciparum*. X. Asembo Bay Cohort Project. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *113*(2), 279–287.
- Fatafta, H., Samantray, S., Sayyed-Ahmad, A., Coskuner-Weber, O., & Strodel, B. (2021). Molecular simulations of IDPs: From ensemble generation to IDP interactions leading to disorder-to-order transitions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *183*, 135–185.
- Favuzza, P., Guffart, E., Tamborrini, M., Scherer, B., Dreyer, A. M., Rufer, A. C., Erny, J., Hoernschemeyer, J., Thoma, R., Schmid, G., Gsell, B., Lamelas, A., Benz, J., Joseph, C., Matile, H., Pluschke, G., & Rudolph, M. G. (2017). Structure of the malaria vaccine candidate antigen CyRPA and its complex with a parasite invasion inhibitory antibody. *eLife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.20383>
- Fernández-Quintero, M. L., Kraml, J., Georges, G., & Liedl, K. R. (2019). CDR-H3 loop ensemble in solution – conformational selection upon antibody binding. In *mAbs* (Vol. 11, Issue 6, pp. 1077–1088). <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1618676>
- Fernández-Quintero, M. L., Loeffler, J. R., Kraml, J., Kahler, U., Kamenik, A. S., & Liedl, K. R. (2018). Characterizing the Diversity of the CDR-H3 Loop Conformational Ensembles in Relationship to Antibody Binding Properties. *Frontiers in Immunology*, *9*, 3065.
- Fernández-Quintero, M. L., Vangone, A., Loeffler, J. R., Seidler, C. A., Georges, G., & Liedl, K. R. (2022). Paratope states in solution improve structure prediction and docking. *Structure*, *30*(3), 430–440.e3.
- Ferreira, M. M. C. (2015). *Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações*. Editora da Unicamp.
- Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., & McGreevy, R. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of* <https://pubs.aip.org/aip/jcp/article/153/4/044130/1064953>
- Fischer, E. (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, *27*(3), 2985–2993.
- Godara, P., Naik, B., Meghwal, R., Ojha, R., Srivastava, V., Prajapati, V. K., & Prusty, D.

- (2022). Rational designing of peptide-ligand conjugates-based immunotherapy for the treatment of complicated malaria. *Life Sciences*, 311(Pt A), 121121.
- Gogoi, D., Yadav, R. N. S., & Dutta, P. (n.d.). *Identification of Potential Natural Products as Novel Anti-malarials via Comparative Docking Study, Network Pharmacology and DFT Analysis*.
https://ijprajournal.com/issue_dcp/Identification%20of%20Potential%20Natural%20Products%20as%20Novel%20Antimalarials%20via%20Comparative%20Docking%20Study,%20Network%20Pharmacology%20and%20DFT%20Analysis.pdf
- Gomes, A. P., Vitorino, R. R., Costa, A. de P., Mendonça, E. G. de, Oliveira, M. G. de A., & Siqueira-Batista, R. (2011). Malária grave por Plasmodium falciparum. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23(3), 358–369.
- González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École Thématique de La Société Française de La Neutronique*, 12, 169–200.
- Guy, A. J., Irani, V., MacRaild, C. A., Anders, R. F., Norton, R. S., Beeson, J. G., Richards, J. S., & Ramsland, P. A. (2015). Insights into the Immunological Properties of Intrinsically Disordered Malaria Proteins Using Proteome Scale Predictions. *PloS One*, 10(10), e0141729.
- Hamelberg, D., Mongan, J., & McCammon, J. A. (2004). Accelerated molecular dynamics: a promising and efficient simulation method for biomolecules. *The Journal of Chemical Physics*, 120(24), 11919–11929.
- Harpole, T. J., & Delemotte, L. (2018). Conformational landscapes of membrane proteins delineated by enhanced sampling molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*, 1860(4), 909–926.
- Hatzakis, N. S. (2014). Single molecule insights on conformational selection and induced fit mechanism. *Biophysical Chemistry*, 186, 46–54.
- Healer, J., Murphy, V., Hodder, A. N., Masciantonio, R., Gemmill, A. W., Anders, R. F., Cowman, A. F., & Batchelor, A. (2004). Allelic polymorphisms in apical membrane antigen-1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in Plasmodium falciparum. *Molecular Microbiology*, 52(1), 159–168.
- Helal, M. A., Shouman, S., Abdelwaly, A., Elmehrath, A. O., Essawy, M., Sayed, S. M., Saleh, A. H., & El-Badri, N. (2022). Molecular basis of the potential interaction of SARS-CoV-2 spike protein to CD147 in COVID-19 associated-lymphopenia. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 40(3), 1109–1119.
- Hénin, J., Lelièvre, T., Shirts, M. R., Valsson, O., & Delemotte, L. (2022). Enhanced

- Sampling Methods for Molecular Dynamics Simulations [Article v1.0]. In *Living Journal of Computational Molecular Science* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.33011/livecoms.4.1.1583>
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, *99*(6), 1129–1143.
- Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., Grubmüller, H., & MacKerell, A. D., Jr. (2017). CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*, *14*(1), 71–73.
- Hug, S. (2013). Classical molecular dynamics in a nutshell. *Methods in Molecular Biology*, *924*, 127–152.
- Igonet, S., Vulliez-Le Normand, B., Faure, G., Riottot, M.-M., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., & Bentley, G. A. (2007). Cross-reactivity studies of an anti-Plasmodium vivax apical membrane antigen 1 monoclonal antibody: binding and structural characterisation. *Journal of Molecular Biology*, *366*(5), 1523–1537.
- Imkeller, K., Scally, S. W., Bosch, A., Martí, G. P., Costa, G., Triller, G., Murugan, R., Renna, V., Jumaa, H., Kreamsner, P. G., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Mordmüller, B., Levashina, E. A., Julien, J.-P., & Wardemann, H. (2018). Antihomotypic affinity maturation improves human B cell responses against a repetitive epitope. *Science*, *360*(6395), 1358–1362.
- Izrailev, S., Stepaniants, S., Israilewitz, B., Kosztin, D., Lu, H., Molnar, F., Wriggers, W., & Schulten, K. (1999). Steered Molecular Dynamics. *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas*, 39–65.
- Jeliazkov, J. R., Sljoka, A., Kuroda, D., Tsuchimura, N., Katoh, N., Tsumoto, K., & Gray, J. J. (2018). Repertoire Analysis of Antibody CDR-H3 Loops Suggests Affinity Maturation Does Not Typically Result in Rigidification. *Frontiers in Immunology*, *9*, 413.
- Jones, D. T., & Cozzetto, D. (2015). DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics*, *31*(6), 857–863.
- Julien, J.-P., & Wardemann, H. (2019). Antibodies against Plasmodium falciparum malaria at the molecular level. *Nature Reviews. Immunology*, *19*(12), 761–775.
- Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, *9*(9), 646–652.
- Kciuk, M., Mujwar, S., Szymanowska, A., Marciniak, B., Bukowski, K., Mojzych, M., & Kontek, R. (2022). Preparation of Novel Pyrazolo[4,3-e]tetrazolo[1,5-b][1,2,4]triazine Sulfonamides and Their Experimental and Computational Biological Studies.

International Journal of Molecular Sciences, 23(11).
<https://doi.org/10.3390/ijms23115892>

- Kim, J., Cater, R. J., Choy, B. C., & Mancina, F. (2021). Structural Insights into Transporter-Mediated Drug Resistance in Infectious Diseases. *Journal of Molecular Biology*, 433(16), 167005.
- Kim, J., Tan, Y. Z., Wicht, K. J., Erramilli, S. K., Dhingra, S. K., Okombo, J., Vendome, J., Hagenah, L. M., Giacometti, S. I., Warren, A. L., Nosol, K., Roepe, P. D., Potter, C. S., Carragher, B., Kossiakoff, A. A., Quick, M., Fidock, D. A., & Mancina, F. (2019). Structure and drug resistance of the Plasmodium falciparum transporter PfCRT. *Nature*, 576(7786), 315–320.
- Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G., & Langer, T. (2008). Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection--what can we learn from earlier mistakes? *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 22(3-4), 213–228.
- Kisalu, N. K., Idris, A. H., Weidle, C., Flores-Garcia, Y., Flynn, B. J., Sack, B. K., Murphy, S., Schön, A., Freire, E., Francica, J. R., Miller, A. B., Gregory, J., March, S., Liao, H.-X., Haynes, B. F., Wiehe, K., Trama, A. M., Saunders, K. O., Gladden, M. A., ... Seder, R. A. (2018). A human monoclonal antibody prevents malaria infection by targeting a new site of vulnerability on the parasite [Review of *A human monoclonal antibody prevents malaria infection by targeting a new site of vulnerability on the parasite*]. *Nature Medicine*, 24(4), 408–416.
- Kobayashi, C., Jung, J., Matsunaga, Y., Mori, T., Ando, T., Tamura, K., Kamiya, M., & Sugita, Y. (2017). GENESIS 1.1: A hybrid-parallel molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms on multiple computational platforms. *Journal of Computational Chemistry*, 38(25), 2193–2206.
- Ko, K.-T., Lennartz, F., Mekhaïel, D., Guloglu, B., Marini, A., Deuker, D. J., Long, C. A., Jore, M. M., Miura, K., Biswas, S., & Higgins, M. K. (2022). Structure of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 and its recognition by transmission blocking antibodies. *Nature Communications*, 13(1), 5603.
- Kollman, P. (1993). Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. *Chemical Reviews*, 93(7), 2395–2417.
- Koshland, D. E. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2), 98–104.

- Kovács, I. A., Szalay, M. S., & Csermely, P. (2005). Water and molecular chaperones act as weak links of protein folding networks: energy landscape and punctuated equilibrium changes point towards a game theory of proteins. *FEBS Letters*, *579*(11), 2254–2260.
- Kratochvil, S., Shen, C.-H., Lin, Y.-C., Xu, K., Nair, U., Da Silva Pereira, L., Tripathi, P., Arnold, J., Chuang, G.-Y., Melzi, E., Schön, A., Zhang, B., Dillon, M., Bonilla, B., Flynn, B. J., Kirsch, K. H., Kisalu, N. K., Kiyuka, P. K., Liu, T., ... Batista, F. D. (2021). Vaccination in a humanized mouse model elicits highly protective PfCSP-targeting anti-malarial antibodies. *Immunity*, *54*(12), 2859–2876.e7.
- Krishnarajuna, B., Sugiki, T., Morales, R. A. V., Seow, J., Fujiwara, T., Wilde, K. L., Norton, R. S., & MacRaild, C. A. (2018). Transient antibody-antigen interactions mediate the strain-specific recognition of a conserved malaria epitope. *Communications Biology*, *1*, 58.
- Kundu, P., Semesi, A., Jore, M. M., Morin, M. J., Price, V. L., Liang, A., Li, J., Miura, K., Sauerwein, R. W., King, C. R., & Julien, J.-P. (2018). Structural delineation of potent transmission-blocking epitope I on malaria antigen Pfs48/45. *Nature Communications*, *9*(1), 4458.
- Kuroda, D., & Tsumoto, K. (2023). Structural Classification of CDR-H3 in Single-Domain VHH Antibodies. *Methods in Molecular Biology*, *2552*, 61–79.
- Laurens, M. B. (2020). RTS,S/AS01 vaccine (MosquirixTM): an overview. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *16*(3), 480–489.
- Lawson, A. D. G., MacCoss, M., & Heer, J. P. (2018). Importance of rigidity in designing small molecule drugs to tackle protein-protein interactions (PPIs) through stabilization of desired conformers. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(10), 4283–4289.
- Lennartz, F., Adams, Y., Bengtsson, A., Olsen, R. W., Turner, L., Ndam, N. T., Ecklu-Mensah, G., Moussiliou, A., Ofori, M. F., Gamain, B., Lusingu, J. P., Petersen, J. E. V., Wang, C. W., Nunes-Silva, S., Jespersen, J. S., Lau, C. K. Y., Theander, T. G., Lavstsen, T., Hviid, L., ... Jensen, A. T. R. (2017). Structure-Guided Identification of a Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria. *Cell Host & Microbe*, *21*(3), 403–414.
- Lennartz, F., Brod, F., Dabbs, R., Miura, K., Mekhaïel, D., Marini, A., Jore, M. M., Søgaard, M. M., Jørgensen, T., de Jongh, W. A., Sauerwein, R. W., Long, C. A., Biswas, S., & Higgins, M. K. (2018). Structural basis for recognition of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 by a transmission blocking antibody. *Nature Communications*, *9*(1), 3822.
- Liao, Q. (2020). Enhanced sampling and free energy calculations for protein simulations.

Progress in Molecular Biology and Translational Science, 170, 177–213.

- Lim, S. S., Yang, W., Krishnarjuna, B., Kannan Sivaraman, K., Chandrashekar, I. R., Kass, I., MacRaid, C. A., Devine, S. M., Debono, C. O., Anders, R. F., Scanlon, M. J., Scammells, P. J., Norton, R. S., & McGowan, S. (2014). Structure and dynamics of apical membrane antigen 1 from *Plasmodium falciparum* FVO. *Biochemistry*, 53(46), 7310–7320.
- Liwo, A. (2018). *Computational Methods to Study the Structure and Dynamics of Biomolecules and Biomolecular Processes: From Bioinformatics to Molecular Quantum Mechanics*. Springer.
- Ma, B., Kumar, S., Tsai, C. J., & Nussinov, R. (1999). Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Engineering*, 12(9), 713–720.
- Mackerell, A. D., Jr. (2004). Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1584–1604.
- MacKerell, A. D., Jr, Banavali, N., & Foloppe, N. (2000). Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers*, 56(4), 257–265.
- MacKerell, A. D., Jr, Bashford, D., & Bellott, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins †. *The Journal of* https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp973084f?casa_token=klIIVV2XX-SkAAAAA:eX_g5DSExGaJc-TFVj5Cs4Yi00uSip7tL8XPQ1DE__nA82R8NODWFNyH0zJ_X_8VICN8JGDihsoGSV1
- Mackerell, A. D., Jr, Feig, M., & Brooks, C. L., 3rd. (2004). Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 25(11), 1400–1415.
- MacRaid, C. A., Richards, J. S., Anders, R. F., & Norton, R. S. (2016). Antibody Recognition of Disordered Antigens. *Structure*, 24(1), 148–157.
- MacRaid, C. A., Seow, J., Das, S. C., & Norton, R. S. (2018). Disordered epitopes as peptide vaccines. *Peptide Science*, 110(3), e24067.
- Mahita, J., Kim, D.-G., Son, S., Choi, Y., Kim, H.-S., & Bailey-Kellogg, C. (2022). Computational epitope binning reveals functional equivalence of sequence-divergent paratopes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 2169–2180.
- Marsh, J. A., & Teichmann, S. A. (2011). Relative solvent accessible surface area predicts protein conformational changes upon binding. *Structure*, 19(6), 859–867.
- Martínez, J. M., & Martínez, L. (2003). Packing optimization for automated generation of

- complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking. *Journal of Computational Chemistry*, 24(7), 819–825.
- Martínez, L. (2015). Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. *PloS One*, 10(3), e0119264.
- Martínez, L., Andrade, R., Birgin, E. G., & Martínez, J. M. (2009). PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 30(13), 2157–2164.
- Martínez, L., Borin, I. A., & Skaf, M. S. (2007). Fundamentos de simulação por dinâmica molecular. *Métodos de Química Teórica E Modelagem Molecular*, 413–452.
- McCarthy, J. S., Marjason, J., Elliott, S., Fahey, P., Bang, G., Malkin, E., Tierney, E., Aked-Hurditch, H., Adda, C., Cross, N., Richards, J. S., Fowkes, F. J. I., Boyle, M. J., Long, C., Druilhe, P., Beeson, J. G., & Anders, R. F. (2011). A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide® ISA 720. *PloS One*, 6(9), e24413.
- McLeod, B., Mabrouk, M. T., Miura, K., Ravichandran, R., Kephart, S., Hailemariam, S., Pham, T. P., Semesi, A., Kucharska, I., Kundu, P., Huang, W.-C., Johnson, M., Blackstone, A., Pettie, D., Murphy, M., Kraft, J. C., Leaf, E. M., Jiao, Y., van de Vegte-Bolmer, M., ... Julien, J.-P. (2022). Vaccination with a structure-based stabilized version of malarial antigen Pfs48/45 elicits ultra-potent transmission-blocking antibody responses. *Immunity*, 55(9), 1680–1692.e8.
- McLeod, B., Miura, K., Scally, S. W., Bosch, A., Nguyen, N., Shin, H., Kim, D., Volkmuth, W., Rämisch, S., Chichester, J. A., Streatfield, S., Woods, C., Schief, W. R., Emerling, D., King, C. R., & Julien, J.-P. (2019). Potent antibody lineage against malaria transmission elicited by human vaccination with Pfs25. *Nature Communications*, 10(1), 4328.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., & Teller, E. (1953). Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6), 1087–1092.
- Miao, Y., & McCammon, J. A. (2016). Unconstrained Enhanced Sampling for Free Energy Calculations of Biomolecules: A Review. *Molecular Simulation*, 42(13), 1046–1055.
- Minkah, N. K., & Kappe, S. H. I. (2021). Malaria vaccine gets a parasite boost in the liver [Review of *Malaria vaccine gets a parasite boost in the liver*]. *Nature*, 595(7866), 173–174.

- Mishra, P. M., Verma, N. C., Rao, C., Uversky, V. N., & Nandi, C. K. (2020). Intrinsically disordered proteins of viruses: Involvement in the mechanism of cell regulation and pathogenesis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 174, 1–78.
- Monticelli, L., & Tieleman, D. P. (2013). Force fields for classical molecular dynamics. *Methods in Molecular Biology*, 924, 197–213.
- Morales, R. A. V., MacRaild, C. A., Seow, J., Krishnarjuna, B., Drinkwater, N., Rouet, R., Anders, R. F., Christ, D., McGowan, S., & Norton, R. S. (2015). Structural basis for epitope masking and strain specificity of a conserved epitope in an intrinsically disordered malaria vaccine candidate. *Scientific Reports*, 5, 10103.
- Mosharaf, M. P., Reza, M. S., Kibria, M. K., Ahmed, F. F., Kabir, M. H., Hasan, S., & Mollah, M. N. H. (2022). Computational identification of host genomic biomarkers highlighting their functions, pathways and regulators that influence SARS-CoV-2 infections and drug repurposing. *Scientific Reports*, 12(1), 4279.
- Mueller, M. S., Renard, A., Boato, F., Vogel, D., Naegeli, M., Zurbriggen, R., Robinson, J. A., & Pluschke, G. (2003). Induction of parasite growth-inhibitory antibodies by a virosomal formulation of a peptidomimetic of loop I from domain III of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. *Infection and Immunity*, 71(8), 4749–4758.
- Murugan, R., Scally, S. W., Costa, G., Mustafa, G., Thai, E., Decker, T., Bosch, A., Prieto, K., Levashina, E. A., Julien, J.-P., & Wardemann, H. (2020). Evolution of protective human antibodies against Plasmodium falciparum circumsporozoite protein repeat motifs. *Nature Medicine*, 26(7), 1135–1145.
- Nair, M., Hinds, M. G., Coley, A. M., Hodder, A. N., Foley, M., Anders, R. F., & Norton, R. S. (2002). Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (AMA1). *Journal of Molecular Biology*, 322(4), 741–753.
- Nguyen, P. T. V., Nguyen, G. L. T., Thi Đình, O., Duong, C. Q., Nguyen, L. H., & Truong, T. N. (2022). In search of suitable protein targets for anti-malarial and anti-dengue drug discovery. *Journal of Molecular Structure*, 1256, 132520.
- Nivedha, A. K., Lee, S., & Vaidehi, N. (2023). Biased agonists differentially modulate the receptor conformation ensembles in Angiotensin II type 1 receptor. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 118, 108365.
- Njoroge, M., Njuguna, N. M., Mutai, P., Ongarora, D. S. B., Smith, P. W., & Chibale, K. (2014). Recent approaches to chemical discovery and development against malaria and the neglected tropical diseases human African trypanosomiasis and schistosomiasis.

Chemical Reviews, 114(22), 11138–11163.

- Oyen, D., Torres, J. L., Aoto, P. C., Flores-Garcia, Y., Binter, Š., Pholcharee, T., Carroll, S., Reponen, S., Wash, R., Liang, Q., Lemiale, F., Locke, E., Bradley, A., King, C. R., Emerling, D., Kellam, P., Zavala, F., Ward, A. B., & Wilson, I. A. (2020). Structure and mechanism of monoclonal antibody binding to the junctional epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *PLoS Pathogens*, 16(3), e1008373.
- Oyen, D., Torres, J. L., Cottrell, C. A., Richter King, C., Wilson, I. A., & Ward, A. B. (2018). Cryo-EM structure of *P. falciparum* circumsporozoite protein with a vaccine-elicited antibody is stabilized by somatically mutated inter-Fab contacts. *Science Advances*, 4(10), eaau8529.
- Oyen, D., Torres, J. L., Wille-Reece, U., Ockenhouse, C. F., Emerling, D., Glanville, J., Volkmuth, W., Flores-Garcia, Y., Zavala, F., Ward, A. B., King, C. R., & Wilson, I. A. (2017). Structural basis for antibody recognition of the NANP repeats in *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(48), E10438–E10445.
- Parvizpour, S., Pourseif, M. M., Razmara, J., Rafi, M. A., & Omidi, Y. (2020). Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. *Drug Discovery Today*, 25(6), 1034–1042.
- Peng, Y., Cao, Z., Zhou, R., & Voth, G. A. (2014). Path Integral Coarse-Graining Replica Exchange Method for Enhanced Sampling. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(9), 3634–3640.
- Persson, H., Ye, W., Wernimont, A., Adams, J. J., Koide, A., Koide, S., Lam, R., & Sidhu, S. S. (2013). CDR-H3 diversity is not required for antigen recognition by synthetic antibodies. *Journal of Molecular Biology*, 425(4), 803–811.
- Pholcharee, T., Oyen, D., Flores-Garcia, Y., Gonzalez-Paez, G., Han, Z., Williams, K. L., Volkmuth, W., Emerling, D., Locke, E., Richter King, C., Zavala, F., & Wilson, I. A. (2021). Structural and biophysical correlation of anti-NANP antibodies with in vivo protection against *P. falciparum*. *Nature Communications*, 12(1), 1063.
- Pholcharee, T., Oyen, D., Torres, J. L., Flores-Garcia, Y., Martin, G. M., González-Páez, G. E., Emerling, D., Volkmuth, W., Locke, E., King, C. R., Zavala, F., Ward, A. B., & Wilson, I. A. (2020). Diverse Antibody Responses to Conserved Structural Motifs in *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein. *Journal of Molecular Biology*, 432(4), 1048–1063.
- Pizarro, J. C., Chitarra, V., Verger, D., Holm, I., Pêtres, S., Darteville, S., Nato, F., Longacre,

- S., & Bentley, G. A. (2003). Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. *Journal of Molecular Biology*, *328*(5), 1091–1103.
- Pritam, M., Singh, G., Swaroop, S., Singh, A. K., Pandey, B., & Singh, S. P. (2020). A cutting-edge immunoinformatics approach for design of multi-epitope oral vaccine against dreadful human malaria. *International Journal of Biological Macromolecules*, *158*, 159–179.
- Qi, R., Wei, G., Ma, B., & Nussinov, R. (2018). Replica Exchange Molecular Dynamics: A Practical Application Protocol with Solutions to Common Problems and a Peptide Aggregation and Self-Assembly Example. *Methods in Molecular Biology*, *1777*, 101–119.
- Ragotte, R. J., Pulido, D., Lias, A. M., Quinkert, D., Alanine, D. G. W., Jamwal, A., Davies, H., Nacer, A., Lowe, E. D., Grime, G. W., Illingworth, J. J., Donat, R. F., Garman, E. F., Bowyer, P. W., Higgins, M. K., & Draper, S. J. (2022). Heterotypic interactions drive antibody synergy against a malaria vaccine candidate. *Nature Communications*, *13*(1), 933.
- Rangarajan, N., Kulkarni, P., & Hannenhalli, S. (2015). Evolutionarily conserved network properties of intrinsically disordered proteins. *PloS One*, *10*(5), e0126729.
- Robertson, M. J., Tirado-Rives, J., & Jorgensen, W. L. (2015). Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(7), 3499–3509.
- Robustelli, P., Piana, S., & Shaw, D. E. (2020). Mechanism of Coupled Folding-upon-Binding of an Intrinsically Disordered Protein. *Journal of the American Chemical Society*, *142*(25), 11092–11101.
- Salo-Ahen, O. M. H., Alanko, I., Bhadane, R., Bonvin, A. M. J. J., Honorato, R. V., Hossain, S., Juffer, A. H., Kabedev, A., Lahtela-Kakkonen, M., Larsen, A. S., Lescrinier, E., Marimuthu, P., Mirza, M. U., Mustafa, G., Nunes-Alves, A., Pantsar, T., Saadabadi, A., Singaravelu, K., & Vanmeert, M. (2020). Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. *Processes*, *9*(1), 71.
- Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *13*(4), 1518–1524.
- Scally, S. W., McLeod, B., Bosch, A., Miura, K., Liang, Q., Carroll, S., Reponen, S., Nguyen,

- N., Giladi, E., Rämisch, S., Yusibov, V., Bradley, A., Lemiale, F., Schief, W. R., Emerling, D., Kellam, P., King, C. R., & Julien, J.-P. (2017). Molecular definition of multiple sites of antibody inhibition of malaria transmission-blocking vaccine antigen Pfs25. *Nature Communications*, 8(1), 1568.
- Scally, S. W., Murugan, R., Bosch, A., Triller, G., Costa, G., Mordmüller, B., Kremsner, P. G., Sim, B. K. L., Hoffman, S. L., Levashina, E. A., Wardemann, H., & Julien, J.-P. (2018). Rare PfCSP C-terminal antibodies induced by live sporozoite vaccination are ineffective against malaria infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 215(1), 63–75.
- Schor, M., Mey, A. S. J. S., & MacPhee, C. E. (2016). Analytical methods for structural ensembles and dynamics of intrinsically disordered proteins. *Biophysical Reviews*, 8(4), 429–439.
- Scott, W. R. P., Hünenberger, P. H., Tironi, I. G., Mark, A. E., Billeter, S. R., Fennen, J., Torda, A. E., Huber, T., Krüger, P., & van Gunsteren, W. F. (1999). The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. In *The Journal of Physical Chemistry A* (Vol. 103, Issue 19, pp. 3596–3607). <https://doi.org/10.1021/jp984217f>
- Sela-Culang, I., Kunik, V., & Ofran, Y. (2013). The structural basis of antibody-antigen recognition. *Frontiers in Immunology*, 4, 302.
- Seow, J., Das, S. C., Morales, R. A. V., Ataide, R., Krishnarjuna, B., Silk, M., Chalmers, D. K., Richards, J., Anders, R. F., MacRaild, C. A., & Norton, R. S. (2021). Guiding the Immune Response to a Conserved Epitope in MSP2, an Intrinsically Disordered Malaria Vaccine Candidate. *Vaccines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/vaccines9080855>
- Seow, J., Morales, R. A. V., MacRaild, C. A., Krishnarjuna, B., McGowan, S., Dingjan, T., Jaipuria, G., Rouet, R., Wilde, K. L., Atreya, H. S., Richards, J. S., Anders, R. F., Christ, D., Drinkwater, N., & Norton, R. S. (2017). Structure and Characterisation of a Key Epitope in the Conserved C-Terminal Domain of the Malaria Vaccine Candidate MSP2. *Journal of Molecular Biology*, 429(6), 836–846.
- Serrano, M. L., Gauna, A., Pérez, H. A., Squitieri, E., & Medina, J. D. (2009). Structure of a Fab Complex with the C-terminal fragment of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* determined by Computational Docking. *Journal of Computational Methods in Science and Engineering*, 9(4-6), 353–361.
- Shrestha, U. R., Smith, J. C., & Petridis, L. (2021). Full structural ensembles of intrinsically disordered proteins from unbiased molecular dynamics simulations. *Communications Biology*, 4(1), 243.

- Singh, K., Burkhardt, M., Nakuchima, S., Herrera, R., Muratova, O., Gittis, A. G., Kelnhofer, E., Reiter, K., Smelkinson, M., Veltri, D., Swihart, B. J., Shimp, R., Jr, Nguyen, V., Zhang, B., MacDonald, N. J., Duffy, P. E., Garboczi, D. N., & Narum, D. L. (2020). Structure and function of a malaria transmission blocking vaccine targeting Pfs230 and Pfs230-Pfs48/45 proteins. *Communications Biology*, 3(1), 395.
- Sinha, S., Biswas, A., Mondal, J., & Mandal, K. (n.d.). *Computational and experimental studies of the breathing motion of a protein loop: implications in PfAMA1-PfRON2 late-stage binding event*. Retrieved January 30, 2023, from <https://europepmc.org/article/ppr/ppr405901>
- Sookpongthai, P., Utayopas, K., Sitthiyotha, T., Pengsakul, T., Kaewthamasorn, M., Wangkanont, K., Harnyuttanakorn, P., Chunsriviro, S., & Pattaradilokrat, S. (2021). Global diversity of the gene encoding the Pfs25 protein—a Plasmodium falciparum transmission-blocking vaccine candidate. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1–19.
- Sugita, Y., & Okamoto, Y. (1999). Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*, 314(1), 141–151.
- Sun, Z., Liu, Q., Qu, G., Feng, Y., & Reetz, M. T. (2019). Utility of B-Factors in Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability. *Chemical Reviews*, 119(3), 1626–1665.
- Swope, W. C., Andersen, H. C., Berens, P. H., & Wilson, K. R. (1982). A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *The Journal of Chemical Physics*, 76(1), 637–649.
- Tan, J., Piccoli, L., & Lanzavecchia, A. (2019). The Antibody Response to Plasmodium falciparum: Cues for Vaccine Design and the Discovery of Receptor-Based Antibodies. *Annual Review of Immunology*, 37, 225–246.
- Tan, S. (johnathan), Do, D. D., & Nicholson, D. (2020). Consistency of NVT, NPT, μ VT and Gibbs (NV2T and NPT) with kinetic Monte Carlo schemes. *Chemical Engineering Journal*, 401, 126056.
- Thai, E., Costa, G., Weyrich, A., Murugan, R., Oyen, D., Flores-Garcia, Y., Prieto, K., Bosch, A., Valleriani, A., Wu, N. C., Pholcharee, T., Scally, S. W., Wilson, I. A., Wardemann, H., Julien, J.-P., & Levashina, E. A. (2020). A high-affinity antibody against the CSP N-terminal domain lacks Plasmodium falciparum inhibitory activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(11). <https://doi.org/10.1084/jem.20200061>
- Thouvenel, C. D., Fontana, M. F., Netland, J., Krishnamurty, A. T., Takehara, K. K., Chen, Y.,

- Singh, S., Miura, K., Keitany, G. J., Lynch, E. M., Portugal, S., Miranda, M. C., King, N. P., Kollman, J. M., Crompton, P. D., Long, C. A., Pancera, M., Rawlings, D. J., & Pepper, M. (2021). Multimeric antibodies from antigen-specific human IgM+ memory B cells restrict Plasmodium parasites. *The Journal of Experimental Medicine*, 218(4). <https://doi.org/10.1084/jem.20200942>
- Torrie, G. M., & Valleau, J. P. (1977). Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*, 23(2), 187–199.
- Triller, G., Scally, S. W., Costa, G., Pissarev, M., Kreschel, C., Bosch, A., Marois, E., Sack, B. K., Murugan, R., Salman, A. M., Janse, C. J., Khan, S. M., Kappe, S. H. I., Adegnik, A. A., Mordmüller, B., Levashina, E. A., Julien, J.-P., & Wardemann, H. (2017). Natural Parasite Exposure Induces Protective Human Anti-Malarial Antibodies. *Immunity*, 47(6), 1197–1209.e10.
- Tubiana, T., Carvaille, J.-C., Boulard, Y., & Bressanelli, S. (2018). TTClust: A Versatile Molecular Simulation Trajectory Clustering Program with Graphical Summaries. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(11), 2178–2182.
- Van Gunsteren, W. F., & Berendsen, H. J. C. (1988). A Leap-frog Algorithm for Stochastic Dynamics. *Molecular Simulation*, 1(3), 173–185.
- van Oss, C. J., Good, R. J., & Chaudhury, M. K. (1986). Nature of the antigen-antibody interaction: Primary and secondary bonds: Optimal conditions for association and dissociation. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 376, 111–119.
- Verlet, L. (1967). Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physics Review*, 159(1), 98–103.
- Vogt, A. D., & Di Cera, E. (2013). Conformational selection is a dominant mechanism of ligand binding. *Biochemistry*, 52(34), 5723–5729.
- Voronin, A., Weiel, M., & Schug, A. (2020). Including residual contact information into replica-exchange MD simulations significantly enriches native-like conformations. *PLoS One*, 15(11), e0242072.
- Vulliez-Le Normand, B., Saul, F. A., Hoos, S., Faber, B. W., & Bentley, G. A. (2017). Cross-reactivity between apical membrane antigen 1 and rhoptry neck protein 2 in *P. vivax* and *P. falciparum*: A structural and binding study. *PLoS One*, 12(8), e0183198.
- Wang, L., Friesner, R. A., & Berne, B. J. (2011). Replica exchange with solute scaling: a more efficient version of replica exchange with solute tempering (REST2). *The Journal*

- of Physical Chemistry. B*, 115(30), 9431–9438.
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236–244.
- Wicht, K. J., Small-Saunders, J. L., Hagenah, L. M., Mok, S., & Fidock, D. A. (2022). Mutant PfCRT Can Mediate Piperaquine Resistance in African Plasmodium falciparum With Reduced Fitness and Increased Susceptibility to Other Antimalarials. *The Journal of Infectious Diseases*, 226(11), 2021–2029.
- Withers-Martinez, C., Strath, M., Hackett, F., Haire, L. F., Howell, S. A., Walker, P. A., Christodoulou, E., Dodson, G. G., & Blackman, M. J. (2014). The malaria parasite egress protease SUB1 is a calcium-dependent redox switch subtilisin. *Nature Communications*, 5, 3726.
- Wright, K. E., Hjerrild, K. A., Bartlett, J., Douglas, A. D., Jin, J., Brown, R. E., Illingworth, J. J., Ashfield, R., Clemmensen, S. B., de Jongh, W. A., Draper, S. J., & Higgins, M. K. (2014). Structure of malaria invasion protein RH5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies. *Nature*, 515(7527), 427–430.
- Wright, P. E., & Jane Dyson, H. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 293, Issue 2, pp. 321–331). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3110>
- Wu, X., Brooks, B. R., & Vanden-Eijnden, E. (2016). Self-guided Langevin dynamics via generalized Langevin equation. *Journal of Computational Chemistry*, 37(6), 595–601.
- Xie, Y., Li, X., Chai, Y., Song, H., Qi, J., & Gao, G. F. (2021). Structural basis of malarial parasite RIFIN-mediated immune escape against LAIR1. *Cell Reports*, 36(8), 109600.
- Yamashita, T. (2018). Toward rational antibody design: recent advancements in molecular dynamics simulations. *International Immunology*, 30(4), 133–140.
- Yan, J., Mizianty, M. J., Filipow, P. L., Uversky, V. N., & Kurgan, L. (2013). RAPID: fast and accurate sequence-based prediction of intrinsic disorder content on proteomic scale. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(8), 1671–1680.
- Yao, B., Zheng, D., Liang, S., & Zhang, C. (2013). Conformational B-cell epitope prediction on antigen protein structures: a review of current algorithms and comparison with common binding site prediction methods. *PloS One*, 8(4), e62249.
- Zhang, W., Ganguly, D., & Chen, J. (2012). Residual structures, conformational fluctuations, and electrostatic interactions in the synergistic folding of two intrinsically disordered proteins. *PLoS Computational Biology*, 8(1), e1002353.