

ANEXO 1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T CD8+ A EPÍTOPES MUTADOS PRESENTADOS EN EL CONTEXTO DE LA MOLÉCULA HLA-B*35 Y DERIVADOS DE LA PROTEÍNA GAG DE CEPAS DE VIH-1 CIRCULANTES EN MEDELLÍN, COLOMBIA.

Este anexo contiene los datos y los análisis realizados de la respuesta y perfil funcional de los linfocitos T CD8+ (LT CD8+) a péptidos mutados de los epítopes HY9 y HA9 presentados por el alelo HLA-B*35 en individuos VIH-1+. Este análisis se realiza de forma adicional al Trabajo de Grado de Alexandra Sánchez; el cual se centró en el análisis de la respuesta funcional de los LT CD8+ a péptidos mutados de los epítopes GC9 y SL9 presentados por el alelo HLA-A*02. Esta separación se hizo con el fin de discutir en mayor profundidad y claridad particularidades encontradas en la respuesta por cada alelo. En este análisis se presentan los análisis realizados para las mutaciones en un formato resumido y como información adicional a su trabajo.

Estudios realizados en el grupo de investigación han identificado sitios seleccionados positivamente en secuencias de Gag, que podrían actuar como epítopes presentados por los alelos HLA-A*02 como mencionamos anteriormente y también epítopes en el HLA-B*35 [1], el cual es el alelo más frecuente en nuestra población del locus HLA-B [2], y el se ha asociado a una más rápida progresión de la enfermedad del SIDA [3]. Los análisis de refinamiento y docking molecular sugirieron que una combinación de mutaciones en el epítope HY9, las cuales se asociaron con una disminuida afinidad de unión del epítope a su correspondiente HLA (**Table 1**). Además, se observó la selección de mutaciones en el epítope HA9 para HLA-B*35, en los cuales se encontró que tienen aumento en la afinidad de unión a sus respectivos HLA-I (**Table 1**).

Inicialmente se determinó la magnitud de la respuesta y perfil funcional de los LT CD8+ que se estimularon con el epítope silvestre HY9 y los péptidos mutados NNSQVSNQY (H124N/S125N7N126S) y NNSKVSQNY (H124N/S125N/N126S/Q127K). La mayoría de los individuos expresaban IFN- γ y marcador de degranulación CD107a con los péptidos silvestres y mutados (**Figure 2**); además, se observó que menos del 16% de los individuos presentaba un porcentaje de LT CD8+ IL-2+ mayor al 1% (**Figure 1**). De

los mecanismos efectores evaluados, resalta que aproximadamente el 50% de los individuos evaluados responden a los péptidos mutados (H124N/S125N7N126S y H124N/S125N/N126S/Q127K), asociados con baja afinidad de unión al HLA-B*35, con la expresión de granzima B (GrzB) y perforina, respuesta citotóxica que se ha relacionado con la eliminación de células infectadas con VIH. Al comparar entre los péptidos evaluados el porcentaje de LT CD8+ expresando CD107a+ GrzB+ o CD107a+ perforina+ se observó que los porcentajes más altos se obtuvieron al estimular con el péptido mutado H124N/S125N/N126S/Q127K, el cual se asocia con baja afinidad de unión al HLA-B*35 (**Figure 1**). Respecto al perfil funcional, la respuesta a los péptidos se caracteriza por ser monofuncional, predominando la producción de GrzB.

Los LT CD8+ estimulados con el epítipo silvestre HA9 o con péptidos mutados (I223V, I223A y V219A/H219Q/I223V) presentaban una respuesta heterogénea, observándose un mayor porcentaje de individuos que respondían con IFN γ al estímulo con el epítipo silvestre HA9, péptido mutado I223V e I223A, comparado con el péptido mutado V219A/H219Q/I223V (**Figure 3**). Respecto a la respuesta de IL-2 e IL-10 posterior a los estímulos, se observó que, independiente del péptido, la mayoría de los pacientes se encontraba ausente o inferior al 0,4% la expresión de estas citoquinas (**Figure 3**). En el caso de las moléculas asociadas con degranulación y moléculas citotóxicas, se observó una mayor respuesta frente a los péptidos mutados (asociados con una alta afinidad de unión al HLA) comparado con el epítipo silvestre HA9 (Figure 4).

Table 1. List of the wild type and mutated HY9 and HA9 epitopes

Protein	Position in Gag	Epitope	Wild Type Sequence	Mutated Sequence	Abbreviation Mutated Sequence	Peptide Affinity relative to WT
Gag-p17	124-132	HY9	HSNQVSQNY	<u>N</u> NSQVSQNY	H124N/S125N/N126S	Decrease
				NNSK <u>V</u> SQNY	H124N/S125N/N126S/Q127K	Decrease
Gag-p17	216-224	HA9	HPVHAGPIA	HPVHAGP <u>V</u> A	I223V	Increase
				HPVHAGP <u>A</u> A	I223A	Increase
				HPA <u>Q</u> AGP <u>V</u> A	V218A/H219Q/I223V	Increase

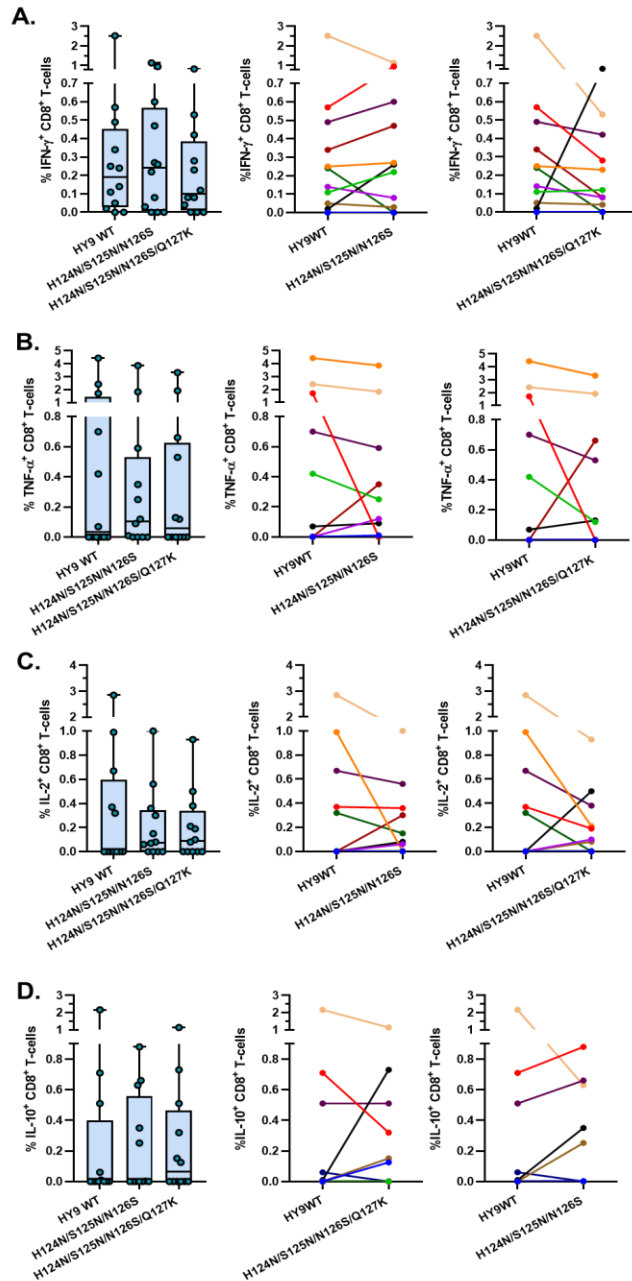


Figure 1. Cytokine CD8⁺ T-cell response to HY9 WT and mutated peptides. Frequency of CD8⁺ T-cells positive for IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-2 (C), and IL-10 (D). Each symbol represents the CD8⁺ T-cell response in an individual in response to each peptide (10 μ g/mL) after subtraction of the negative control. In the left, box-and-whisker plots depict the median and IQR. In the right is shown the comparison between each mutated peptide with the WT condition. The Wilcoxon signed-rank test was performed to compare each mutated peptide with the WT, n=10-12.

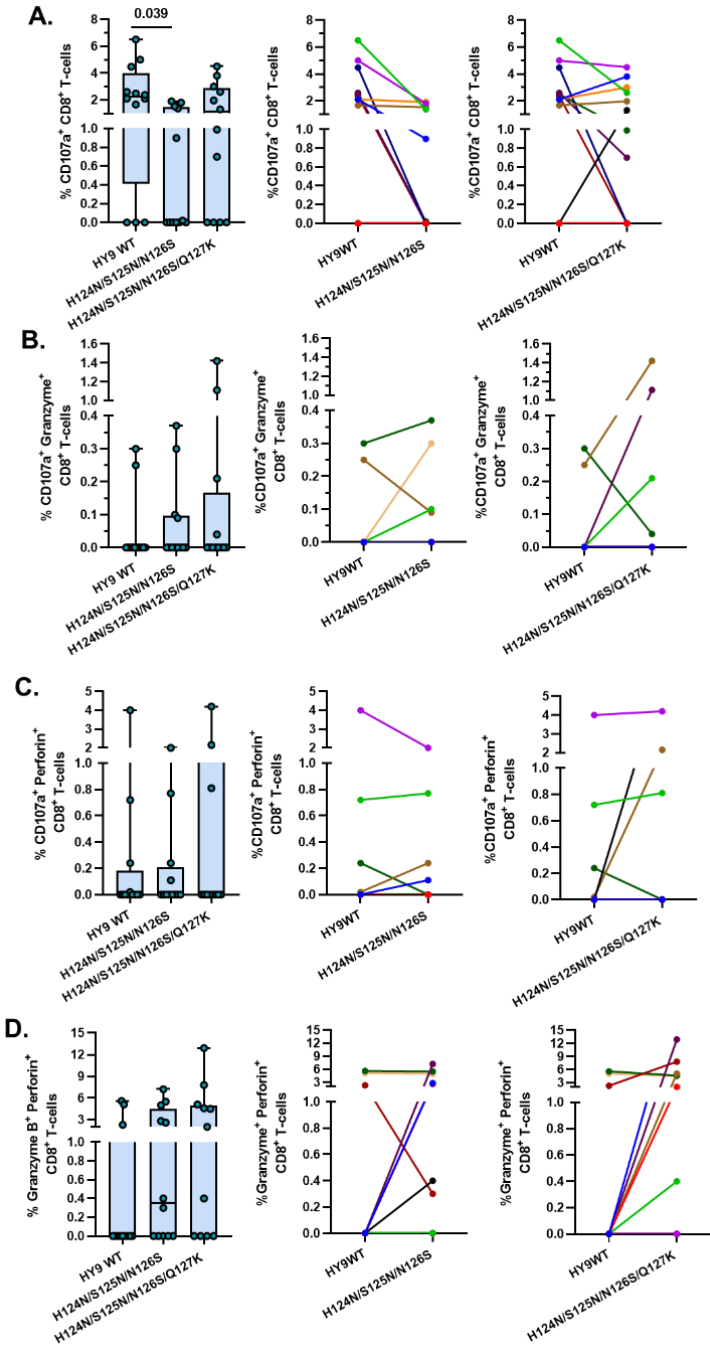


Figure 2. Cytotoxic CD8⁺ T-cell response to HY9 WT and mutated peptides. Frequency of CD8⁺ T-cells positive for CD107a alone (**A**), and CD107a together with Granzyme B (**B**) or Perforin (**C**), as well as the coexpression of Granzyme B and Perforin (**D**). Each symbol represents the CD8⁺ T-cell response in an individual in response to each peptide (10 µg/mL) after subtraction of the negative control. In the left, box-and-whisker plots depict the median and IQR. In the right is shown the comparison between each mutated peptide with the WT condition. Wilcoxon test was performed to compare each mutated peptide with the WT, n=12.

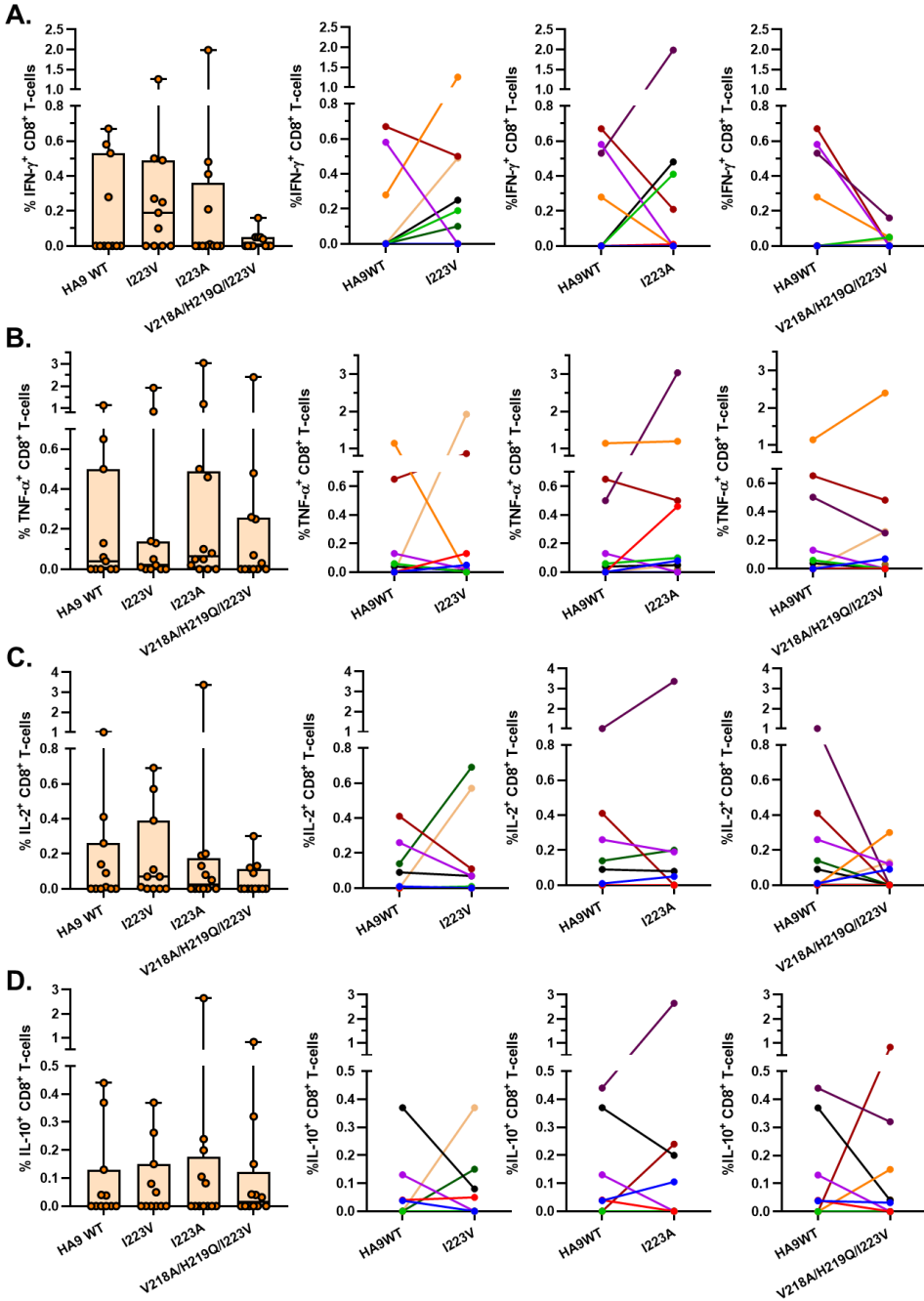


Figure 3. Cytokine CD8⁺ T-cell response to HA9 WT and mutated peptides. Frequency of CD8⁺ T-cells positive for IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-2 (C), and IL-10 (D). Each symbol represents the CD8⁺ T-cell response in an individual in response to each peptide (10 μ g/mL) after subtraction of the negative control. In the left, box-and-whisker plots depict the median and IQR. In the right is shown the comparison between each mutated peptide with the WT condition. The Wilcoxon signed-rank test was performed to compare each mutated peptide with the WT, n=9-12.

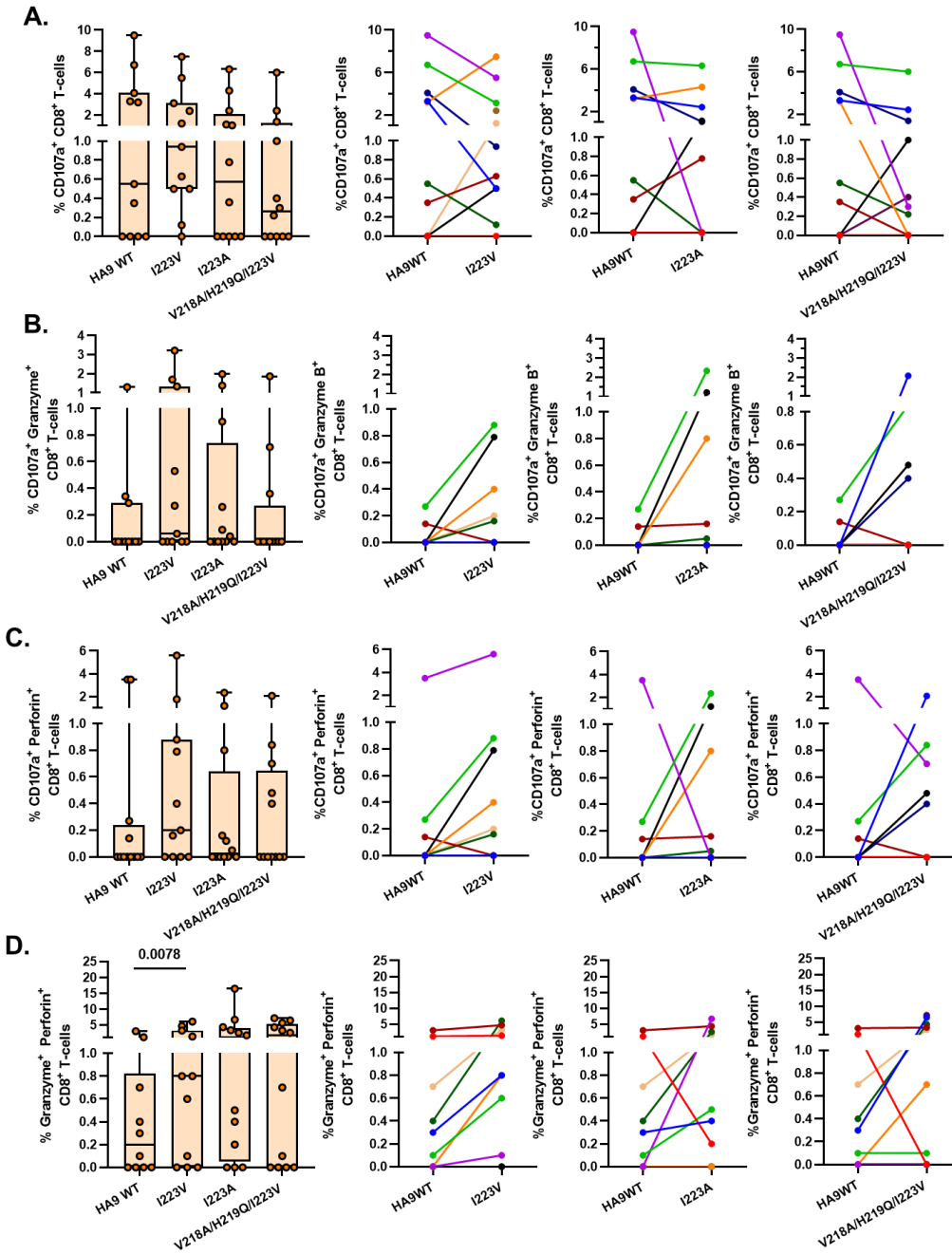


Figure 4. Cytotoxic CD8⁺ T-cell response to HA9 WT and mutated peptides. Frequency of CD8⁺ T-cells positive for CD107a alone (**A**), and CD107a together with Granzyme B (**B**) or Perforin (**C**), as well as the coexpression of Granzyme B and Perforin (**D**). Each symbol represents the CD8⁺ T-cell response in an individual in response to each peptide (10 µg/mL) after subtraction of the negative control. In the left, box-and-whisker plots depict the median and IQR. In the right is shown the comparison between each mutated peptide with the WT condition. Wilcoxon test was performed to compare each mutated peptide with the WT, n=9-12.

REFERENCIAS

- [1] D. Arcia, R. Ochoa, J.C. Hernández, C.M. Álvarez, F.J. Díaz, P.A. Velilla, L. Acevedo-Sáenz, Potential immune escape mutations under inferred selection pressure in HIV-1 strains circulating in Medellín, Colombia, *Infect. Genet. Evol.* 69 (2019) 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.001>.
- [2] L.M. Rodríguez, M.C. Giraldo, N. García, L. Velásquez, S.C. París, C.M. Álvarez, L.F. García, Human leucocyte antigen gene (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) frequencies in deceased organ donor, *Biomedica.* 27 (2007) 537–547. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i4.172>.
- [3] A. Grifoni, Key role of human leukocyte antigen in modulating human immunodeficiency virus progression: An overview of the possible applications, *World J. Virol.* 4 (2015) 124. <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i2.124>.