



DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA 3D DA PLEUROTOLISINA B DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* (MPPLYB) POR MODELAGEM COMPARATIVA

¹Ana Carolina Costa de Jesus (UNEB) – ana_carolinacj@hotmail.com; ²Samuel Rocha da Silva Pita (UFBA) – samuelpita@gmail.com; ³Acássia Benjamim Leal Pires (UNEB) – acassiabenjamim@gmail.com;

Resumo: *Moniliophthora perniciosa* é o fungo causador da doença “Vassoura de Bruxa” em cacauzeiros. O presente trabalho teve como objetivo construir, por Modelagem Comparativa, a estrutura tridimensional da proteína MpPlyB identificada neste fungo para posteriormente estudar sua interação com proteínas aegerolisinas também identificadas nele. A sequência primária de MpPlyB obtida do UNIPROT foi usada para seleção dos moldes através do BLAST. As sequências de MpPlyB e dos moldes (4OEJ e 4OV8) de *Pleurotus ostreatus* foram alinhadas através do Clustal Omega, e os modelos 3D construídos pelo Modeller 9.18. Os 100 modelos gerados foram validados pelo QMEAN, PROCHECK e VERIFY 3D e visualizados pelo PYMOL. Após análises, o modelo 38 melhor atendeu aos critérios estabelecidos.

Palavras-Chaves: *Moniliophthora perniciosa*; Aegerolisinas; Pleurotolisina B; Modelagem Comparativa; Modeller.

3D STRUCTURE DETERMINATION OF THE PLEUROTOLISIN B OF *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* (MPPLYB) THROUGH COMPARATIVE MODELING

Abstract: *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of Witches’ Broom disease of cacao. The objective of this work was to construct, by comparative modeling, the three-dimensional structure of the MpPlyB protein identified in this fungus, to later study its interaction with aegerolysin proteins also identified in it. The primary MpPlyB sequence obtained from UNIPROT was used for identification and selection of templates through BLAST. The MpPlyB and template sequences (4OEJ and 4OV8) from *Pleurotus ostreatus* were aligned through Clustal Omega, and the 3D models constructed by Modeller 9.18. The 100 generated models were validated by QMEAN, PROCHECK and VERIFY 3D and visualized by PYMOL. After analysis, the model 38 was the one that best met the established criteria.

Keywords: *Moniliophthora perniciosa*; Aegerolysins; Pleurotolysin B; Comparative Modeling; Modeller.



1. INTRODUÇÃO

Os cacauzeiros (*Theobroma cacao*) são afetados por uma doença fúngica conhecida por “Vassoura de Bruxa”. Embora não ocorra em todos os países produtores, chegou na Bahia, Brasil, em 1989 e provocou sérios prejuízos econômicos e sociais¹. Logo após a introdução da doença, o Brasil passou de 2º maior exportador de cacau no mundo para importador². O agente causador é um basidiomiceto hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*³. Ele produz basidiósporos que se disseminam pelo ar e infectam os tecidos meristemáticos provocando hipertrofia e hiperplasia dos tecidos distais assim como a perda da dominância apical. Em seguida, produzem estruturas anormais conhecidas como “vassouras verdes” que, posteriormente, se tornam necrosadas evoluindo para “vassouras secas”⁴.

1.1. Pleurotolisinas

A proteína MpPlyB, semelhante à Pleurotolisina B de *Pleurotus ostreatus* foi identificada na fase de frutificação desse fungo⁵. A pleurotolisina é uma citolisina bi-componente específica para esfingomielina. O componente A possui o domínio aegerolisina (comum em proteínas da família Aegerolisina) e o B possui o domínio MACPF (Complexo de Ataque à Membrana/Perforina), presente em proteínas da família Pleurotolisina Formadora de Poros⁶. Membros de ambas as famílias vêm sendo associadas a mecanismos de proteção e defesa e como fator de virulência em diversas bactérias e fungos patogênicos⁷. Essa capacidade de formar poros em membranas biológicas e se ligarem a lipídios específicos levanta a possibilidade do envolvimento delas no processo de infecção do fungo, bem como sua possível utilização biotecnológica, principalmente como marcador biológico.

1.1.1 Modelagem Comparativa de Proteínas

Baseado no princípio da função de uma proteína ser determinada pela sua estrutura tridimensional, a predição da estrutura 3D por Modelagem Comparativa constitui o primeiro passo para entender seu papel biológico. A base da Modelagem Comparativa é a predição estrutural de proteínas desconhecidas a partir de uma (ou mais) proteína alvo cuja estrutura tridimensional já foi elucidada e que possua elevada similaridade e identidade sequencial com o alvo⁸. Neste contexto, o desenvolvimento de um modelo 3D da MpPlyB permitirá compreender a interação desta proteína com as outras proteínas MpPlyA1 e MpPlyA2 do fungo, corroborando para o entendimento dos mecanismos de frutificação e patogenicidade do *M. perniciosa*. Esse entendimento é importante para o desenvolvimento de medidas de controle da “Vassoura de Bruxa”, além da possibilidade de utilizar este conhecimento na criação de nanoporos para introdução de fármacos e outras



moléculas no interior das células, visando o tratamento e o diagnóstico personalizado de doenças humanas⁹.

2. METODOLOGIA

A sequência primária da Pleurotolisina B de *M. perniciosus* (MpPlyB) foi obtida do UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>, código: E2LXB5). A seleção das sequências moldes com estruturas 3D resolvidas foram obtidas no *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>, PDB). Utilizando a busca através do alinhamento local pela ferramenta do BLASTP, disponível na plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foram selecionados os moldes com maior grau de identidade (considerando o valor mínimo de 25%), maior cobertura e similaridade sequencial, maior resolução experimental, *e-value* igual a zero e menor número de *gaps*. Após a seleção das sequências moldes no BLAST (4OV8 e 4OEJ), empregou-se o alinhamento múltiplo destas sequências juntamente com a proteína alvo (E2LXB5) no programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

A partir do alinhamento múltiplo de sequências, o Modeller 9.18¹⁰ foi empregado para construção de 100 modelos 3D da Pleurotolisina B de *M. perniciosus* (MpPlyB). Os modelos preditos foram submetidos à análise da qualidade através de diversos parâmetros. Inicialmente, quanto à energia, por meio do servidor *Qualitative Model Energy ANalysis* (QMEAN, <https://swissmodel.expasy.org/qmean/>), foram selecionados os 35 modelos com melhores valores de QMEAN⁶¹¹ e, posteriormente, os 10 melhores modelos com base na análise do valor de *SS Agree*. Em seguida, estes modelos foram avaliados quanto à estereoquímica por meio do gráfico de Ramachandran¹², utilizando o programa PROCHECK¹³. Ao final, a avaliação da compatibilidade entre a estrutura 3D predita e a estrutura 1D dos modelos foi realizada através do servidor VERIFY 3D¹⁴. Por fim, o enovelamento (*folding*) do melhor modelo foi comparado aos moldes através do programa Pymol, versão 2.1¹⁵.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação e seleção dos moldes

O alinhamento local realizado pelo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) junto ao banco de dados do PDB retornou cinco estruturas: 4OEJ_A, 4V2T_A, 4V2T_1, 4OV8_A e 4V3A_C. As proteínas 4OEJ e 4OV8 pertencentes ao fungo *Pleurotus ostreatus* foram selecionadas pois apresentaram, em geral, os melhores parâmetros. A 4OEJ apresentou 61 de identidade, 94% de cobertura de alinhamento e 2,2 de resolução, enquanto a 4OV8 apresentou 64% de identidade, 87% de cobertura de alinhamento e 2,15 Å de resolução. A elevada identidade apresentada pelos moldes torna-se adequada para sua utilização na Modelagem Comparativa, que aceita identidade mínima de 25% para geração de modelos de qualidade⁸. A similaridade, por sua vez, maior que 70% indica manutenção das propriedades



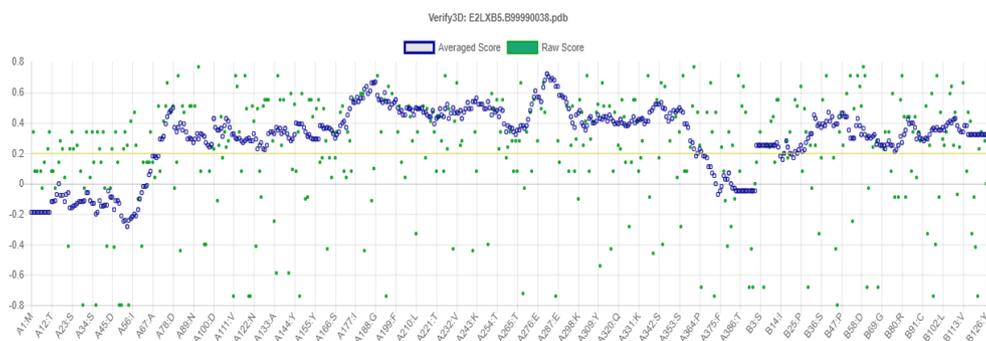
físico-químicas dos resíduos de aminoácidos, aliadas a um *score* de pontuação também elevados. Desta forma, elas foram selecionadas como proteínas molde para a construção da Pleurotolisina B de *M. perniciosus* (MpPlyB).

O *e-value*, que reflete a análise estatística do alinhamento¹⁶, apresentou valor igual a zero para os moldes, o que reflete maior confiabilidade nos resultados. Foi ainda observado um baixo índice de *gaps* (entre 4 e 6%), indicando que há poucas diferenças no tamanho entre as sequências, e menores inserções e deleções de resíduos entre elas¹⁷. A alta resolução verificada nos moldes selecionados, decorrente do método de Difração de Raios-X, fornece mapas de densidade eletrônica bastante definidos, o que implica na maior confiabilidade da posição dos átomos e, portanto, torna os moldes selecionados adequados para a construção de um bom modelo tridimensional¹⁸. A análise pelo Clustal Omega evidenciou regiões de não correspondência entre as sequências, que condizem com os *gaps* e geralmente estão relacionados às regiões de alça.

3.2 Construção e avaliação dos Modelos 3D

Foram gerados 100 modelos 3D da Pleurotolisina B de *M. perniciosus* (MpPlyB) pelo Modeller 9.18¹⁰ e os mesmos foram analisados quanto aos seus parâmetros energéticos. Os 35 melhores modelos foram separados, e em seguida, os 10 melhores foram selecionados a partir dos valores de *SS Agree*, representando os estados energeticamente mais favoráveis para a MpPlyB. O modelo 40 foi o que apresentou o melhor valor do QMEAN6 e o mais próximo dos moldes utilizados, contudo, a diferença do valor do QMEAN6 e *SS Agree* entre os 10 modelos foi mínima o que ressalta que os mesmos são equivalentes em valores numéricos. A compatibilidade entre as estruturas 3D e suas sequências primárias foi avaliada através do servidor VERIFY-3D (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>). Nesta análise, os modelos cuja estrutura 3D correspondam a estrutura 1D pontuam positivamente num *score* $\geq 0,2$. Dos 10 modelos avaliados, 9 não atenderam ao *score* 3D-1D, possuindo menos de 80% dos resíduos correspondentes a esta pontuação. O modelo que melhor atendeu a este parâmetro foi o modelo 38 (**Fig. 1**) que apresentou 80% dos resíduos dentro da pontuação exigida, valores estes compatíveis com os moldes: 86,65% (**4OEJ**) e 86,39% (**4OV8**).

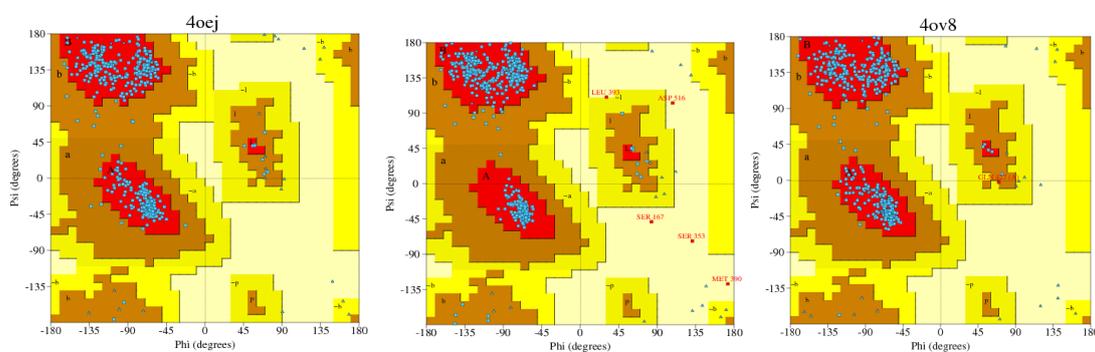
Figura 1. Gráfico com análise do score 1D-3D do Verify 3D para o Modelo 38





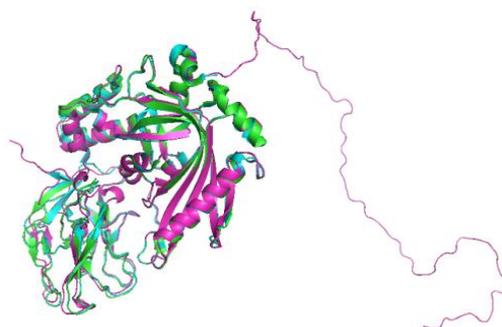
O resultado da análise estereoquímica pelo PROCHECK (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>)¹³, mostrou que o modelo 38 apresentou 94,5% de resíduos nas regiões mais favoráveis, valor próximo aos encontrados nos moldes **4OEJ** e **4OV8** com 93,9% e 94,7%, respectivamente (**Fig.2**). Assim como os moldes, os modelos apresentaram elevada qualidade estérica, com mais de 90% dos resíduos em regiões mais favoráveis, sendo assim considerados bons modelos¹³.

Figura 2. Gráficos de Ramachandran dos moldes **4OEJ**, **4OV8** e do Modelo 38 obtidos pelo PROCHECK¹³.



Após a avaliação de todos estes parâmetros, foi selecionado o modelo 38, pois este atendia melhor os critérios pré-estabelecidos. O Pymol foi empregado na sobreposição deste modelo com as proteínas moldes (**Fig. 3**).

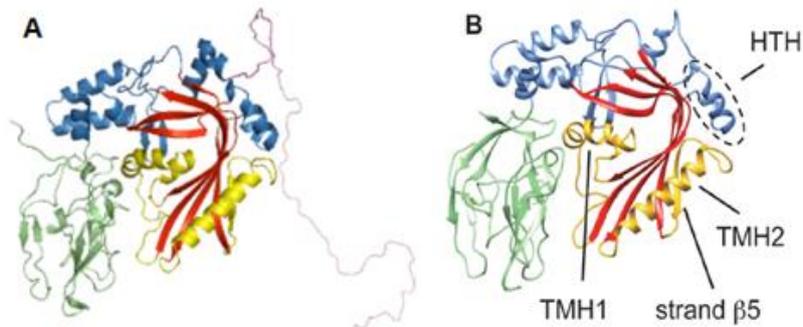
Figura 3. Representação da estrutura 3D dos moldes **4OEJ** (verde) e **4OV8** (ciano) e do melhor modelo (magenta) gerado pelo Modeller 9.18¹⁰.



Assim como obtido experimentalmente para a Pleurotolisina B (PlyB) de *P. ostreatus*¹⁹, nota-se a presença das regiões de domínio MACPF/CDC (Complexo de Ataque à Membrana/Perforina/Citolisina Colesterol Dependente) na porção N-terminal na estrutura do melhor modelo (38) como indicadas na **Figura 4**.



Figura 4. Comparação entre a estrutura 3D do modelo gerado 38 (A) e o molde utilizado Pleurotolisina B (PlyB) de *P. ostreatus*¹⁹ (B) evidenciando as regiões de domínios conservados em ambas estruturas.



O domínio MACPF/CDC, visualizado na porção N-terminal da PlyB de *M. pernicioso* e *P. ostreatus*, é caracterizado pelo conjunto de folhas β torcidas (vermelho) delimitadas por três domínios estruturais: um motivo curto de hélice-volta-hélice (azul), e duas α -hélices (amarelo), as quais realizam a inserção em membranas, sendo a maior delas continuada por uma folha β . Apesar de apresentar esta conformação quando no estado monomérico da proteína PlyB de *P. ostreatus*, as α -hélices (amarelo) adquirem uma conformação de β -hairpins para formar o poro quando em sua forma oligomérica. A região C-terminal da MpPlyB, que abrange o domínio rico em folhas- β , faz a ligação com a porção C-terminal da Pleurotolisina A de *P. ostreatus* por meio das alças¹⁹. Para esta região verificou-se que os resíduos dos moldes não possuem correspondência nas sequências alvo e, por conseguinte, esta região não estruturada está disposta em alças (**Figura 4**). Os 70 resíduos que compreendem a região N-terminal do modelo são evidenciadas pela região não estruturada decorrente da não correspondência de resíduos para com os moldes (4OEJ e 4OV8), (**Fig.3**). Dessa forma, como não há resíduos, portanto, a estrutura de referência não pôde ser organizada no modelo. Estes elementos não estruturados tendem a ser flexíveis e são mais susceptíveis a mutações. Todavia, não é incomum que esses elementos se envolvam em contatos proteína-proteína bem como possivelmente, outras moléculas²⁰. Devido à sua localização, este domínio pode indicar um elemento importante na formação do poro durante a patogénia da *M. pernicioso*.

4. CONCLUSÃO

A utilização de métodos computacionais como a Modelagem Comparativa para a determinação da estrutura tridimensional de proteínas tem sido cada vez mais comum⁸. A Modelagem Comparativa mostrou ser uma ferramenta útil na predição de modelos 3D da Pleurotolisina B de *M. pernicioso* (MpPlyB) possuindo ainda a vantagem de ser de baixo custo. Foi possível gerar 100 modelos da MpPlyB através do programa Modeller 9.18, os quais foram selecionados de acordo com a qualidade energética (QMEAN6= -3.67 ; SS Agree= -4.04), estereoquímica (94,5%



de resíduos na região permitida) e estrutural (**Fig. 1 e 3**). Apesar das regiões não estruturadas presentes no melhor modelo da MpPlyB na região C- e N-terminal, a sobreposição deste com os moldes mostrou a conservação dos principais domínios como exemplo o MACPF. Assim concluímos que a estrutura 3D da MpPlyB poderá auxiliar no entendimento da patogênese da “Vassoura de Bruxa” e poderá servir para compreender a função dessa proteína bem como sua utilização em inovações tecnológicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESB (JCB-0039/2013 e RED-008/2013) e à infraestrutura disponibilizada na Universidade do Estado da Bahia, UNEB e Universidade federal da Bahia, UFBA.

5. REFERÊNCIAS

- 1 PEREIRA, J. L. et al. **Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil**. Agrotropica (Brasil) v. 1 (1) p. 79-81, 1989.
- 2 PURDY, L. H. ; SCHMIDT, R. A. **Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management** . Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, Califórnia, US, v. 34, p. 573-594, 1996.
- 3 AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA. W. 2005. **The causal agents of Witches' Broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae** . Mycologia 97(5):1012-22.
- 4 SILVA, S. D. V. M. et al. **Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro**. Agrotropica, v. 1, p. 1-23, 2002.
- 5 PIRES, ACASSIA B .L., et al. **Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and developmentally regulated genes** . BMC Microbiology, v. 9, p.158, 2009.
- 6 OTA, K., et al., **Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B** , Biochimie,2013.
- 7 BUTALA, M., et al. **Aegerolysins: Lipid-binding proteins with versatile functions** , Semin Cell Dev. Biol., May 2017.
- 8 CAPRILES, P. V. S. Z. et al. Modelos tridimensionais. In: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade**. São Paulo: SBBq, 2014. p. 189-208.



9 NOVAK, M. et al. **Fungal aegerolysin-like proteins: distribution, activities, and applications** . Applied microbiology and biotechnology, v. 99, n. 2, p. 601-610, 2015.

10 SALI, A., BLUNDELL, T.L. **Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints**, Journal of Molecular Biology, 234, p. 779-815; 1993.

11 BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. **QMEAN server for protein model quality estimation** . Nucleic Acids Research, v. 37, jul. 2009.

12 RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. **Stereochemistry of polypeptide chain configurations**. Journal of Molecular Biology, v. 7, p. 95-99, jul. 1963.

13 LASKOWSKI, R. A. et al. **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures** . Journal of Applied Crystallography, v. 26, n. 2, p.283–291, 1 abr. 1993.

14 BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. **A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure** . Science, v. 253, n. 5016, p. 164-170, 1991.

15 PYMOL Molecular Graphics System. Versão 2.1. New York, NY: Schrodinger, 2018. Disponível em:<<https://pymol.org/2/>>. Acesso em: 17 jul. 2018.

16 AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R. **O Programa BLAST: guia prático de utilização**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

17 JUNQUEIRA, D. M.; BRAUN, R. L.; VERLI, H. Alinhamentos. In: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade** . São Paulo: SBBq, 2014. p. 39-61.

18 MALUF, F. V. et al. Cristalografia de Proteínas. In: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade** . São Paulo: SBBq, 2014a. p.252-282.

19 LUKOYANOVA, N. et al. (2015) **Conformational Changes during Pore Formation by the Perforin-Related Protein Pleurotolysin**. PLoS Biol 13(2): e1002049.

20 VERLI, H. Níveis de Informação Biológica. In: VERLI, H. (Org.). **Bioinformática: da biologia à flexibilidade** . São Paulo: SBBq, 2014b. p. 14-37.