



Investigação dos Estados Metaestáveis da AvrPtoB no Complexo com Pto: Caracterização Conformacional por Simulações Moleculares

Henrique F. Silva (PG)^{1*}, Rodrigo M. Santos (PG)¹, Elaine F. F. da Cunha (PQ)¹, Teodorico C. Ramalho (PQ)^{1,2}

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000 Lavras, Minas Gerais (henrique.silva13@estudante.ufla.br)

² Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade de Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 500 03 Hradec Kralove, República Tcheca

RESUMO

RESUMO - A demanda crescente por alimentos e biocombustíveis exige estratégias para mitigar perdas por fitopatógenos como a *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, que utiliza a proteína AvrPtoB para suprimir a imunidade vegetal. Utilizando Dinâmica Molecular (DM) e Dinâmica Molecular enviesada, foram exploradas conformações metaestáveis da AvrPtoB, em que a análise de ligações de hidrogênio via PCA identificou três metaestados distintos. A comparação das interfaces nos diferentes estados revelou interações intermoleculares específicas, fornecendo novos insights sobre a estabilidade e o reconhecimento molecular do complexo AvrPtoB-Pto. Estudos de docking mostraram que o metaestado 2 apresentou maior afinidade de ligação que a estrutura cristalográfica, sugerindo uma conformação funcionalmente relevante. Esses achados podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias que reduzam a virulência da bactéria, auxiliando na proteção de culturas agrícolas.

Palavras-chave: AvrPtoB, Ancoramento de proteínas, Pto, Estados metaestáveis, Dinâmica Molecular

Introdução

A crescente demanda por alimentos e a limitação de recursos exigem estratégias eficazes contra perdas causadas por fitopatógenos. Fungos e bactérias, por exemplo, secretam efetores para suprimir a imunidade vegetal e facilitar a infecção (1). A proteína efetora AvrPtoB, de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, interage com a proteína Pto R do tomate resultando na supressão da morte celular programada associada à resposta hipersensitiva (HR), permitindo sua infecção (2). Portanto, o estudo dos mecanismos de interação entre fitopatógenos e seus hospedeiros é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de doenças em plantas. As simulações de dinâmica molecular (DM) permitem analisar o comportamento conformacional das regiões de interação entre AvrPtoB e Pto em condições próximas às fisiológicas. Associada à DM, a Dinâmica enviesada explora estados intermediários, conhecido como metaestados, energeticamente favoráveis dessas interações. Juntas, essas técnicas fornecem insights detalhados sobre o reconhecimento molecular a partir dos metaestados e a estabilidade do complexo AvrPtoB-Pto.

Experimental

Simulação de Dinâmica Molecular

A estrutura cristalina da AvrPtoB em complexo com a kinase Pto do tomate foi adquirida no banco de dados de proteínas Protein Data Bank (PDB), com o código 3HGK, resolução 3.30 Å (3).

Posteriormente, a AvrPtoB foi isolada do complexo e protonada no pH 7.4 utilizando a ferramenta PDB2PQR, permitindo a análise de sua conformação individual. A simulação foi realizada utilizando o campo de força CHARMM36. A dinâmica foi conduzida pelo software GROMACS, versão 2024.1, por um período de 100 ns, sob condições isotérmicas de 300 K (4).

Dinâmica Molecular enviesada

A partir da trajetória e dados da DM, foi conduzido a simulação de DM enviesada com duração de 100 ns. Para isso, foi utilizado o software PLUMED 2, versão 2.8.0, acoplado ao GROMACS 2021.4 (5). Dessa forma, foram geradas as trajetórias enviesadas do sistema em estudo para análise posterior.

Escolha dos descritores

Para a identificação dos metaestados do sistema, foi selecionado como descritores as ligações de hidrogênio que ocorreram com maior frequência ao longo da simulação nas interfaces 1 (resíduos 174 ao 185) e 2 (resíduos 152 ao 161) de interação da AvrPtoB121-205-Pto. A partir dessas interações, foi analisado a variação da distância entre os átomos doadores e aceptores ao longo do tempo. Esses dados foram então utilizados como variáveis para uma Análise de Componentes Principais (PCA), permitindo a identificação de agrupamentos distintos que correspondem aos diferentes metaestados explorados durante a simulação.



Resultados e Discussão

A análise dos descritores permitiu a identificação de três metaestados da proteína AvrPtoB, como pode ser visualizado pela Figura 1 a seguir:

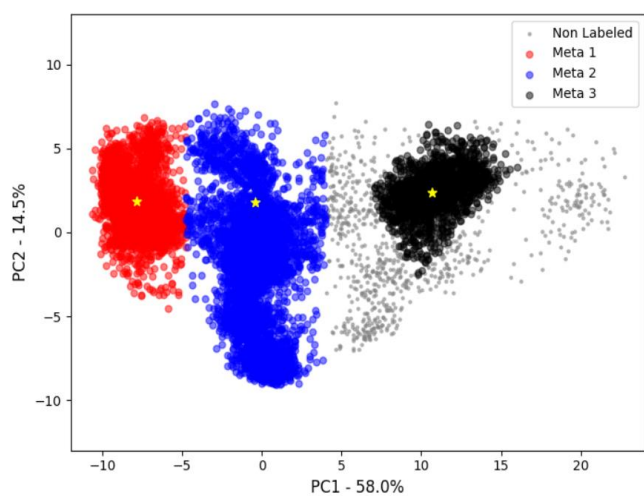


Figura 1. Gráfico de dispersão dos dois primeiros componentes principais (PC1 x PC2) obtidos a partir da Análise de Componentes Principais (PCA). Os agrupamentos em vermelho, azul e preto representam os metaestados 1, 2 e 3 respectivamente.

Os pontos representam conformações ao longo da simulação, enquanto os agrupamentos indicam os três estados metaestáveis identificados para as interfaces 1 e 2 de interação entre AvrPtoB e Pto. Com isso, foi analisado os frames dos 100 ns de simulação que representam os três metaestados. O metaestado 1 representa o frame 3486, o metaestado 2 representa o frame 9891, enquanto o metaestado 3 representa o frame 8325.

Além da análise das interações e conformações dos três metaestados em seus respectivos frames, foi possível realizar o docking dos três metaestados com a Pto para verificar a estabilidade de cada conformação em comparação com o re-docking do cristal. Os resultados podem ser verificados pela Tabela 1.

Tabela 1. Pontuações ponderadas obtidas a partir do docking proteína-proteína entre AvrPtoB e Pto. As estruturas analisadas incluem o redocking da estrutura do cristal e dos três metaestados.

Estrutura	Pontuação ponderada
Redocking	-928.4
Metaestado 1	-856.8
Metaestado 2	-931.24
Metaestado 3	-859.05

Os resultados de docking revelaram que o metaestado 2 exibiu a melhor pontuação ponderada dentre todas as conformações analisadas, superando inclusive o redocking da estrutura cristalográfica. Esse achado indica que, sob as condições simuladas pela dinâmica enviesada, o metaestado 2 pode representar uma conformação mais energeticamente favorável para a interação entre AvrPtoB e Pto.

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que a escolha dos descritores baseados nas ligações de hidrogênio formadas nas interfaces de interação do complexo AvrPtoB-Pto foi eficiente para a caracterização e interpretação dos metaestados do sistema, os quais foram distinguidos por meio de Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada a esses descritores.

A partir dos resultados de docking, o metaestado 2 apresentou a melhor pontuação ponderada entre todas as estruturas analisadas. Esses achados contribuem para a compreensão do reconhecimento molecular entre efetores e proteínas de resistência, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle de fitopatógenos.

Agradecimentos

Agradeço a UFLA, CAPES e MOLECC

Referências

1. M.C. Giraldo; B. Valent, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 800–812.
2. R.B. Abramovitch; G.B. Martin, *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *245*, 1–8.
3. E. Jurrus; et al., *Protein Sci.* **2018**, *27*, 112–128.
4. J. Huang; et al., *Nat. Methods* **2016**, *14*, 71–73.
5. G. Tribello; M. Bonomi; D. Branduardi; C. Camilloni; G. Bussi, *Comput. Phys. Commun.* **2014**, *185*, 604–613.