

Preparação e validação por dinâmica molecular de modelo da Ohr de *Xylella fastidiosa*

Maria Christina C. Peters¹ (IC), Leandro de Rezende¹ (TC), Alberto Malvezzi¹ (PQ), Luis E. S. Netto² (PQ), Antonia T. do Amaral¹ (PQ) * *atdamara@iq.usp.br

¹Depto de Química Fundamental, Instituto de Química, USP, SP, C.P.06077,5513-970 São Paulo, Brasil

²Depto de Genética e Biologia Evolutiva - Instituto de Biociências – USP

Palavras Chave: DM, CVC, *Xylella fastidiosa*, Ohr

Introdução

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) é uma das doenças mais importantes da citricultura brasileira^[1] e é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Os frutos de plantas com CVC são pequenos, endurecidos e amadurecem precocemente. Estes frutos, em geral, são inadequados ao consumo *in natura* e para a industrialização^[2]. Proteínas de resistência a hidroperóxidos orgânicos (Ohr) são proteínas encontradas exclusivamente em bactérias e estão envolvidas na resposta defensiva bacteriana contra peróxidos orgânicos. A Ohr da *X. fastidiosa* é, portanto, um alvo válido para a procura de novos defensivos agrícolas contra a CVC.

A Ohr é uma peroxidase dependente de tiol que apresenta dois resíduos de cisteína essenciais para sua atividade peroxidásica. Ela pode adotar duas conformações significativamente diferentes na região do sítio ativo. É postulado que a configuração “fechada”, com as cisteínas reduzidas, catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos, enquanto que a forma “aberta”, com as cisteínas oxidadas, é requerida para a reciclagem da enzima.^[3] Para a aplicação de estratégias de desenvolvimento de ligantes com base na estrutura da Ohr (SBDD) é necessário conhecer as conformações mais representativas da enzima. A estrutura da Ohr na sua forma “fechada” é conhecida e está disponível no PDB com os códigos 1zb8 e 1zb9, com resolução de 2,40Å e 1,80Å, respectivamente. A estrutura da Ohr na sua forma “aberta” não é conhecida. O objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo da Ohr, por modelagem por homologia e dinâmica molecular, em sua forma “aberta”, para a futura aplicação de estratégias de SBDD.

Resultados e Discussão

A Ohr de *Deinococcus radiodurans* é uma peroxidase homóloga à Ohr de *X. fastidiosa* (52% de homologia) que foi cristalizada em sua forma “aberta” (código PDB 1USP- resolução 1,9Å). Inicialmente foi preparado um modelo por homologia usando programa SWISS MODEL^[4]. A seguir, este modelo foi validado por dinâmica molecular (DM). Foram executadas duas simulações, uma da proteína original em sua conformação “fechada” e uma do modelo por homologia da proteína “aberta”. As simulações foram realizadas no programa Gromacs3.2.1^{[5][6]} utilizando-se o campo de força G43a1. Inicialmente, as estruturas foram submetidas separadamente a minimização pelos métodos *steepest descent* e *conjugate gradient*. A seguir, o sistema foi posicionado no centro de uma

caixa cúbica, com lados de 100 Å e esta caixa foi solvatada com moléculas de água. Após esta etapa o sistema foi neutralizado com a adição de 2 íons de sódio. Subseqüentemente, as moléculas de água e os íons sódio foram minimizados mantendo-se fixos os átomos da proteína, seguido de uma minimização do sistema todo. A seguir, a simulação teve início com o aquecimento do sistema, por um período de 25 ps, até à temperatura de 300 K, seguida de um período de 50 ps para o equilíbrio do sistema. A partir desse ponto deu-se início a coleta de dados por 3 ns, à temperatura e pressão constantes, aplicando-se condições periódicas de contorno. As simulações das ligações de hidrogênios covalentes foram delimitadas pelo algoritmo *Shake*^[7] O intervalo de tempo usado foi de 2 fs. Interações do tipo *Van der Waals* foram limitadas à distância de 9 Å, enquanto que, as interações eletrostáticas foram tratadas pelo método *PME*^[8] Os valores das coordenadas atômicas para toda a trajetória, foram registrados a cada 0,5 ps. A estabilidade das simulações foi avaliada pela variação da energia do sistema e pela variação dos valores de RMSD com relação às conformações iniciais. Distâncias interatômicas entre átomos de resíduos do sítio ativo foram monitoradas para a comparação das duas conformações “fechada” e “aberta”, respectivamente. Foram observados deslocamentos de até 21 Å entre resíduos do sítio ativo da Ohr entre as conformações “fechada” e “aberta”.

Conclusões

A simulação da Ohr de *X. fastidiosa* em sua conformação “fechada” permaneceu estável ($\Delta E/E < 10^{-4}$), validando o protocolo de dinâmica molecular usado. A simulação do modelo por homologia da Ohr em sua conformação “aberta” foi igualmente estável e será usada para a aplicação de estratégias de SBDD para o desenvolvimento de ligantes específicos da enzima.

Agradecimentos

CAPES-PNPD (Proc. 165085), INCT de Processos Redox em Biomedicina Redoxoma (CNPq/FAPESP/MCT).

[1] Laranjeira, F.; *et al.* Trop Plant Pat **2008**, 33(5), 339.

[2] Machado, E.; *et al.* R. Bras. Fisiol. Veg., **1994**(1), 53.

[3] Cécile M., *et al.* J. Bio Chem **2004**, 279 (24), 25830–25837.

[4] Arnold K *et al.*, *Bioinformatics.*, **2006** 22, 195–201.

[5] Lindahl *et al.*, *J. Mol Mod* **2001**, 7, 306–317.

[6] Berendsen *et al.*, *Comp Phy Comm* **1995**, 91, 43–56

[7] Ryckaert *et al.*, *J Comput. Phys.* **1977**, 23, 327–341

[8] MacKerell, edited by B. Roux, M. Watanabe, and O. M. Becker, **2001** pp. 7–38, Marcel Dekker, New York