



Impermeables para hongos: las hidrofobinas y la sal

Diego Eduardo Valerio Moran¹, Nina Pastor

7 de agosto del 20251

Resumen

Las hidrofobinas sufren un cambio conformacional que les permite autoensamblarse en interfases hidrofílicas-hidrofóbicas formando películas anfipáticas, llamadas rodlets, recubriendo la pared celular de los hongos, facilitando la dispersión de esporas por el aire y contribuyendo a la formación de conidios. Dado que son proteínas extracelulares, son sensibles a las condiciones de crecimiento de los hongos. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de variantes de hidrofobinas provenientes de hongos mesófilos (m) y halófilos (h): *Aspergillus fumigatus* (rodA, m), *Aspergillus sydowii* (sih1-4, h), y *Emericellus nidulans* (dewA, m), evaluando su comportamiento bajo tres diferentes concentraciones de sal (50 mM, 2M y 5M NaCl), representando condiciones mesófilas y halófilas. Conforme aumenta la concentración de sal, la proteína recluta más iones en su vecindad, y dado que son negativas, tienen más sodios que cloruros cerca. La dinámica a altas concentraciones de sal afecta directamente la libertad de los cambios conformacionales: mayores concentraciones de sal llevan a una mayor viscosidad, además de efectos específicos de coordinación de iones. Hay una disminución de diversidad conformacional a medida que incrementa la concentración de sal. Las hojas beta son estables, en general, pero las hélices alfa tienden a desnaturalizarse, pero se estabilizan en altas concentraciones de sal. Las proteínas de organismos adaptados a ambientes hipersalinos presentan cargas netas negativas más elevadas que las de organismos mesófilos. El desorden local en estas proteínas sugiere que la exposición de regiones amiloidogénicas que facilitan la polimerización podría estar asociada a la extensión de éstas.



¹ CIDC | UAEM

Introducción

Las hidrofobinas son proteínas presentes en hongos filamentosos, tanto ascomicetos como basidiomicetos. Cuentan con un patrón característico de ocho cisteínas, que forman cuatro puentes disulfuro que estabilizan un barril de láminas β posicionado en el núcleo de la proteína, rodeado de α -hélices y asas largas que contienen secuencias capaces de formar fibras amiloides (figura 1). [1]

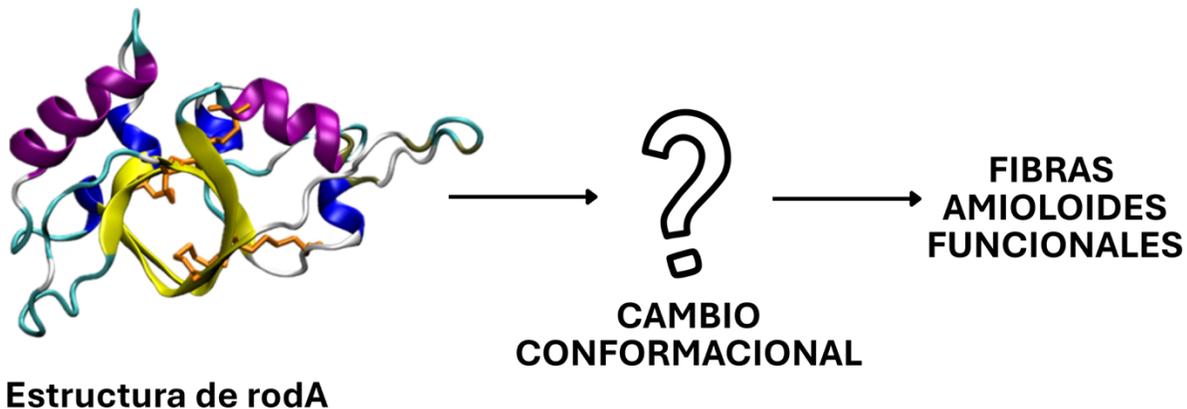


Figura 1. Estructura secundaria de rodA: PDBID 6GCJ α -hélices en magenta, hebras β en amarillo, asas en cian y blanco, puentes disulfuro en naranja.

Las hidrofobinas tienen dos estados funcionales: un estado soluble con la capacidad de mantener su estructura en solución y otro estado anfipático provocado por la agregación. Las hidrofobinas de clase I polimerizan formando rodlets, un amiloide bueno. Por el contrario, las de clase II se agregan en otra morfología. [2]

Los rodlets protegen contra la desecación de los conidios mediante la formación de membranas anfipáticas que los aíslan del solvente. Estas membranas participan en distintos mecanismos de infección y supervivencia del hongo, incluyendo la evasión del sistema inmune. El mecanismo por el cual estos monómeros pasan a una conformación que las lleva a formar fibras amiloides aún no ha sido reportado. [1]

El análisis a nivel de secuencia de las hidrofobinas revela que estas proteínas presentan múltiples regiones amiloidogénicas. Evidencia experimental, basada en estudios de mutagénesis, ha demostrado la relevancia funcional de estas regiones. [2]

En este estudio se modelaron estructuras de hidrofobinas de hongos mesófilos y halófilos, con el objetivo de analizar sus respuestas estructurales y dinámicas frente a diferentes cantidades de sal mediante simulaciones de dinámica molecular. Estas condiciones (50 mM, 2 M y 5 M) correspondieron a ambientes mesófilos, halotolerantes y halófilos, respectivamente, siendo 5 M el límite de solubilidad para NaCl. El propósito fue identificar los cambios conformacionales que podrían desencadenar la formación de fibras amiloides.

Materiales y Métodos

Preparación de estructuras

Las estructuras de las hidrofobinas mesófilas (rodA y dewA) se obtuvieron del PDB (PDBID 6GCJ y 2LSH). Las hidrofobinas sih1 y sih2 de *Aspergillus sydowii* se modelaron por homología con SWISS-MODEL [3] basándose en rodA; el modelo de sih4 tomó a dewA como molde. Dado que la región N-terminal no desempeña un papel relevante en la formación de rodlets en rodA, se recortaron entre 7 y 39 aminoácidos al inicio de las proteínas. El extremo N-terminal fue amidado para reflejar esta ausencia.

Preparación de las cajas y los sistemas

El tamaño de la celda de simulación se determinó midiendo la longitud de las proteínas mediante VMD [4], considerando estructuras extendidas. Dado que todas las hidrofobinas presentaron tamaños similares, se establecieron: 90 Å por lado para 50 mM, 100 Å para 2 M y 110 Å para 5 M. Los sistemas fueron generados en CHARMM-GUI [5]: la solvatación con agua mediante el modelo TIP3P, la adición de iones sodio y cloro en concentraciones correspondientes a cada molaridad, la acetilación del extremo N-terminal, y la conservación de los puentes disulfuro formados entre cisteínas. Aquí se obtuvieron los archivos requeridos para las simulaciones con GROMACS [6], con el campo de fuerza CHARMM36m [7].

Dinámica molecular

Se utilizó un ensamble NPT (número de partículas, presión - 1 atm - y temperatura - 303 K - constantes). Se relajaron los sistemas mediante el algoritmo *steep* con 5,000 pasos. Se equilibraron en dos fases: una sobre el solvente y otra sobre el sistema completo. Al concluir esta etapa, se llevó a cabo una simulación de 1 ns para todo el sistema. A partir de este punto, se inició la etapa de producción con un paso de integración de 4 fs, guardándose *frames* de la trayectoria cada ps, en intervalos de 1 ns, para un tiempo total de 1 μ s de simulación para cada proteína y condición. Como control de calidad, se calculó el RMSD para cada *frame* en bloques de 1 ns.

Predicción de regiones amiloidogénicas y exposición al solvente

La predicción de regiones amiloidogénicas se realizó utilizando el metapredicador Amylpred2. [8]. Se calcularon las áreas accesibles al solvente de los aminoácidos pertenecientes a dichas regiones.

Procesamiento y graficación de datos

Todo el procesamiento y análisis de datos fue realizado empleando R, Linux y Python. Además, se utilizaron herramientas especializadas, como DSSP (integrada en GROMACS) para el análisis de cambios en la estructura secundaria, y CHARMM [5], para el cálculo del área accesible al solvente, así como procesamiento de archivos generados durante la dinámica molecular a través de CHARMM-GUI [5].

Resultados y discusión

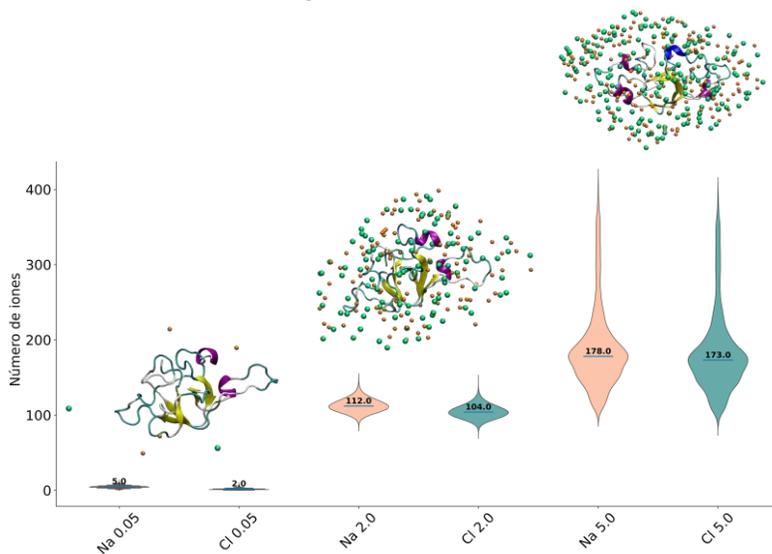


Figura 2. Número de átomos de sodio y cloruro a 10 Å de la proteína sih1

Estructuras de sih1 posicionadas sobre su gráfico de violín correspondiente a 50mM con 5 iones de sodio. 2M, 112 iones de sodio. 5M, 178 iones de sodio. Las proteínas se muestran como listones coloreados según su estructura secundaria. Los gráficos de violín poseen el valor de la mediana para cada concentración simulada (sodio en anaranjado y cloruro en verde).

La cantidad de iones en el entorno inmediato (10 Å) de cada proteína crece en función de la concentración de sal.

En todos los casos, las medianas difieren no sólo entre las distintas concentraciones evaluadas, sino también en el número de átomos de cloro y sodio con los que interactúa. Dado que las hidrofobinas son aniónicas, tienden a atraer un mayor número de cargas positivas (iones sodio) para mantener un ambiente electroneutro local.

La sal, al interactuar directamente con la proteína y estabilizar las cargas aniónicas, podría estar provocando cambios en su estructura secundaria.

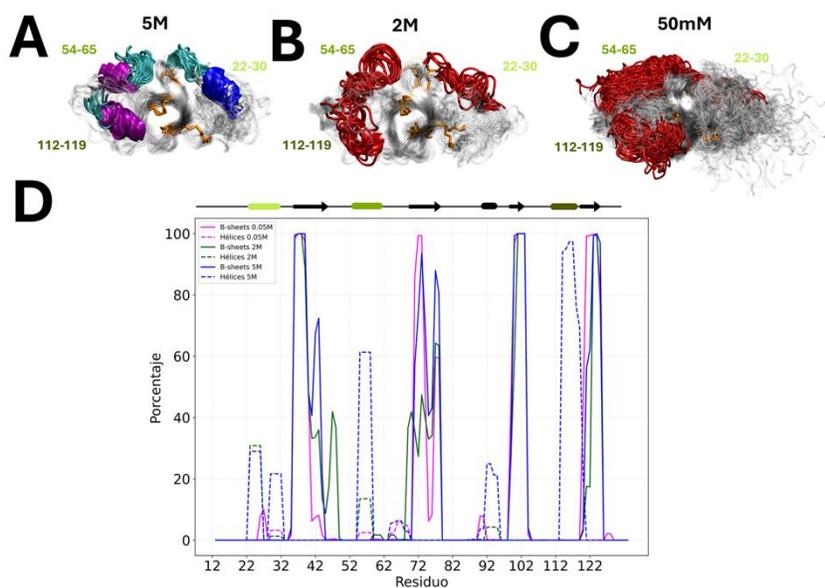


Figura 3. Porcentaje de estructura secundaria y respuesta estructura a sal en *sih1*.

A–C. Se muestra, en un gradiente de color verde, todas las regiones de la secuencia que forman α -hélices (morado) visibles a lo largo de la trayectoria. En las estructuras, la estructura secundaria perdida (**B y C**) se indica en rojo. **D.** Se presenta, con distintos tipos de línea, el porcentaje de α -hélices y hojas β por residuo mantenidas durante el tiempo de simulación a 5M (azul), 2M (verde) y 0.05M (magenta).

sih1 mostró un comportamiento más desordenado en general que el resto de los sistemas simulados. Únicamente las hojas β se mantienen, gracias a los puentes disulfuro. Sin embargo, las α -hélices conservaron su estructura únicamente a 5 M (fig. 3-A); en cambio, a 2 M y 50 mM (figs. 3B–C) se perdieron todas las α -hélices.

Dado el efecto de la sal sobre la proteína, y considerando el mecanismo de agregación amiloide de los *rodlets*, se calculó el área accesible al solvente (SASA) de todas las regiones predichas como amiloidogénicas mediante el software AmylPred2. Hay dos regiones en *sih1*: una en C7–C8 y otra en C3–C4, ambas zonas proclives a desnaturalizarse localmente.

En la región C3-C4 se observa que a mayor cantidad de sal hay una menor exposición (figuras 4-A,B,E). Por el contrario, se observó un comportamiento bimodal de la exposición de la región en C7-C8 a 2 M (figura 4-F). Las figuras 4-C,D muestran el cambio conformacional que exhibe la secuencia amiloidogénica en 2 M, un mecanismo potencial para el inicio de agregación de esta hidrofobina.

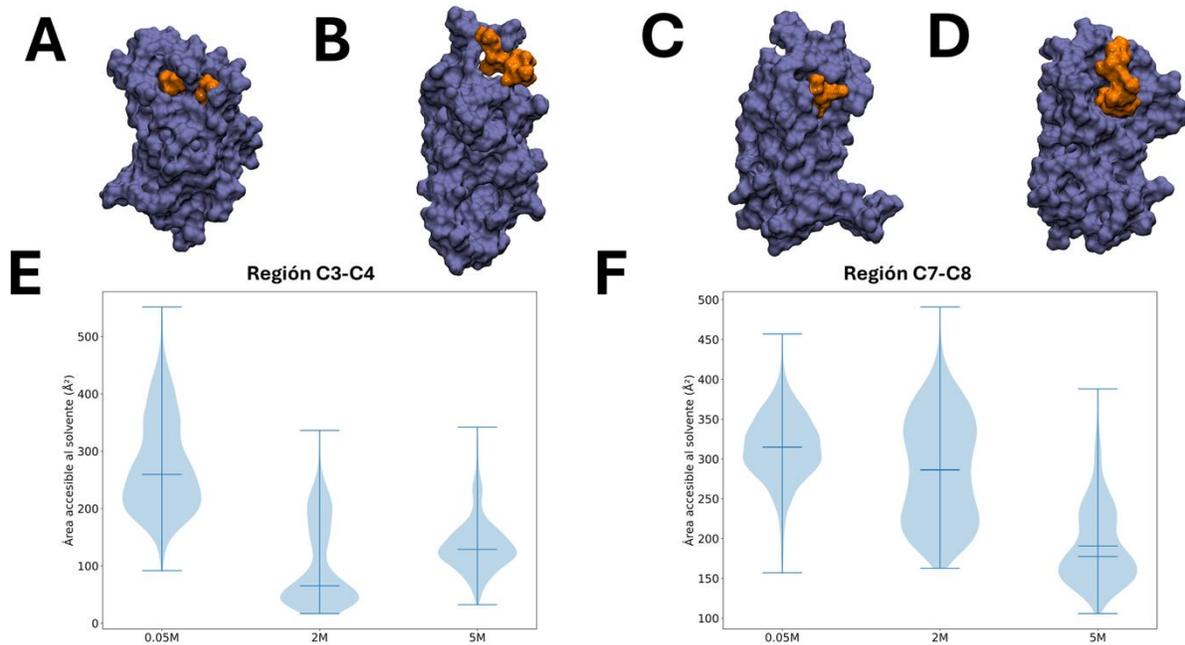


Figura 4. Área expuesta al solvente de regiones amiloidogénicas en *sih1*.

A–D. Estructuras de la proteína con las regiones amiloidogénicas C3–C4 (**A**) Mínima y (**B**) Máxima exposición de la región C3-C4 (naranja) **C**) mínima y **D**) máxima exposición de área de la región amiloidogénica C7–C8 (naranja). Distribución del área accesible al solvente de las regiones amiloidogénicas. **E**) Gráfico de violín del área accesible al solvente para la región C3-C4 y **F**) C7-C8 a diferentes concentraciones de sal.

La región predicha en C7–C8 se encuentra en los aminoácidos 116–121. Al relacionar con los resultados de la figura 3-D, se observa que esta región presenta una α -hélice a 5 M, por lo que resulta notable que la pérdida de esta α -hélice promueva una mayor exposición al solvente de esta región.

Conclusiones y perspectivas

Dada la naturaleza aniónica de las proteínas, todas concentraron más sodio que cloruro en su vecindad inmediata, y reclutaron más iones conforme aumentó la concentración

de sal. Sih1, una de las hidrofobinas con mayor carga negativa neta, es la que mostró una mayor movilidad a distintas concentraciones de sal.

La pérdida de estructura secundaria parece tener un papel relevante en el proceso de agregación de fibras amiloides, ya que facilita la exposición de zonas amiloidogénicas.

El estudio, con un muestreo de 15 microsegundos simulados en 5 sistemas, permitió analizar un posible mecanismo molecular para exponer regiones amiloidogénicas en respuesta a sal. Dado que estas proteínas contienen regiones desordenadas, es importante mejorar el muestreo, por lo que se plantea ampliar el muestreo a tres réplicas de cada sistema simulado.

Referencias

1. **Ball, Sarah R, Kwan, Ann H, et al. (2019)** Hydrophobin Rodlets on the Fungal Cell Wall. *Current topics in microbiology and immunology* :29-51
2. **Valsecchi, Isabel, Lai, Jennifer I, et al. (2019)** Assembly and disassembly of *Aspergillus fumigatus* conidial rodlets. *The Cell Surface* 5:100023-100023
3. **Waterhouse A, et al. (2018).** *SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes*. *Nucleic Acids Res* 46, W296-W303. [29788355](https://doi.org/10.1093/nar/gky427). [10.1093/nar/gky427](https://doi.org/10.1093/nar/gky427)
4. **Humphrey, W., et al,** "VMD - Visual Molecular Dynamics" *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33-38.
5. **S. Jo, T. Kim, et al (2008)** CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 29:1859-1865
6. **H. Bekker, et al.**, "Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations"; pp. 252–256 in *Physics computing 92*. Edited by R.A. de Groot and J. Nadrchal. World Scientific, Singapore, 1993.
7. **J. Lee, et al** CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* 12:405-413
8. **Tsolis AC. A** consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins. *PLoS One.* 2013;8(1):e54175. doi:10.1371/journal.pone.0054175.
9. **Kwan, Y, Winefield, R D, et al. (2006)** Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:3621-3626

Agradecimientos

Agradezco a la **Dra. Nina Pastor Colón, al Dr. Marco Ramírez y a Karin Gonzales** por el valioso apoyo y atención brindada durante este mes de investigación. Extiendo también mi agradecimiento a **LANCAD** por el tiempo de supercómputo otorgado, gracias al cual fue posible realizar gran parte de las simulaciones.