

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Laboratório Nacional de Biociências

**Avaliação computacional do impacto de mutações
patogênicas na transição de fase líquido-líquido da
proteína DDX3X humana**

Pesquisador responsável: Dr. Leandro Oliveira Bortot

Projeto de Iniciação Científica submetido

para o edital PIBIC/CNPEM 2025

Campinas

2025

1. Introdução

Nos últimos anos, o entendimento tradicional da relação estrutura-função de proteínas foi desafiado pela descoberta das proteínas intrinsecamente desordenadas (IDP, do inglês *Intrinsically Disordered Protein*), que conseguem desempenhar atividades biológicas mesmo sem ter uma conformação tridimensional definida. Hoje estima-se que aproximadamente 30% das proteínas de organismos eucariotos sejam desordenadas ou tenham pelo menos uma região intrinsecamente desordenada (IDR, do inglês *Intrinsically Disordered Region*) relevante [1].

Um dos fenômenos em que proteínas com IDRs estão frequentemente envolvidas é a formação de vesículas ou organelas celulares não-membranares através do processo de separação de fase líquido-líquido (LLPS, do inglês *Liquid-Liquid Phase Separation*). Nesse processo são formados microambientes que controlam a organização espacial e modulam reações bioquímicas dentro da célula [2].

Uma das proteínas que participam da formação de vesículas não membranares através de LLPS é a helicase DEAD-box DDX3X humana (hDDX3X). Ela está envolvida na regulação transcricional de várias proteínas, em apoptose e na resposta ao *stress*. Estruturalmente ela é composta por dois domínios que têm atividade helicase dependente de ATP cercada por uma IDR N-terminal e outra C-terminal que estão envolvidas em LLPS. Como reflexo do seu envolvimento em tantas vias celulares, são conhecidas dezenas de mutações da hDDX3X, tanto no seu domínio estruturado quanto nas suas IDRs, que estão envolvidas em processos patológicos relacionados principalmente a câncer e neurodesenvolvimento [3]. Portanto, entender a nível molecular como essas mutações afetam o comportamento de transição de fase e as características físico-químicas dos condensados formados pela hDDX3X pode melhorar nosso entendimento de diversas doenças e possivelmente contribuir para o desenvolvimento de novas terapias no futuro.

Simulações de dinâmica molecular são o método de escolha para a caracterização detalhada da dinâmica conformacional de proteínas. No entanto, a grande variabilidade estrutural das IDPs e IDRs exige a exploração de escalas de tempo ainda inacessíveis a simulações atômicas devido ao elevado custo computacional necessário para amostrar todos os estados relevantes desses sistemas. Por isso, métodos de simulação *coarse-grained* (CG), nos quais vários átomos são modelados como uma única partícula, têm sido usados para caracterizar IDPs e IDRs porque eles conseguem reduzir significativamente o custo computacional sem comprometer substancialmente a precisão dos resultados [4].

2. Estado da arte

A modelagem e simulação de IDPs e IDRs é atualmente a fronteira de conhecimento dos métodos de simulação biomolecular. Em particular, o campo de forças CG Martini é um dos mais usados para simulações de sistemas muito grandes ou por escalas de tempo muito longas e recentemente foi publicado o Martini-IDP, uma versão otimizada especificamente para descrever IDPs e IDRs [4]. Este é o campo de forças que usaremos e, portanto, este projeto trabalhará com o estado-da-arte das simulações de IDPs e IDRs.

3. Objetivos

Nossa hipótese é que mutações patogênicas da hDDX3X afetam sua propensão à LLPS e as características físico-químicas dos condensados formados. O objetivo principal do projeto é comparar, através de simulações de dinâmica molecular, a hDDX3X selvagem

e de pelo menos um mutante patogênico quanto à capacidade de formar condensados e as características físico-químicas de tais condensados.

4. Metodologia

Simulações de dinâmica molecular CG serão executadas utilizando a *engine* de simulação GROMACS com os campos de forças Martini 3.0 e Martini-IDP. Visualizações moleculares serão feitas com o *software* PyMOL. Análises de dados serão feitas combinando ferramentas nativas do pacote GROMACS com *scripts* de desenvolvimento próprio na linguagem Python. O *hardware* será disponibilizado pela infraestrutura de computação de alto desempenho do LNBio/CNPEM, que conta com um supercomputador com 256 CPUs físicas e 8 GPUs NVIDIA A100.

5. Cronograma de atividades

Bimestres 1 e 2: Interação entre IDRs da DDX3X e seus domínios estruturados

Nesta etapa inicialmente será feita a modelagem da hDDX3X completa selvagem e de pelo menos um mutante patogênico que será selecionado com base em dados da literatura. A partir daí, serão feitas simulações de dinâmica molecular CG da proteína isolada. O objetivo será verificar como ocorrem eventuais interações das IDRs N- e C-terminal da hDDX3X com seus próprios domínios estruturados e como as mutações afetam essas interações. Serão comparados os campos de forças Martini 3.0 e Martini-IDP [4].

Bimestre 3: Capacidade de LLPS das IDRs da DDX3X

Na segunda etapa do projeto será avaliada como uma mutação patogênica localizada nas IDRs afeta a capacidade de LLPS e as propriedades físico-químicas dos condensados formados pelas IDRs da hDDX3X isoladas por meio de dois conjuntos de simulações independentes: caixas que contém centenas de cópias (i) da IDR N-terminal ou (ii) centenas de cópias da IDR C-terminal. O objetivo desta etapa é avaliar qual é a capacidade de LLPS de cada uma das IDRs isoladamente e qual é o impacto de mutações.

Bimestres 4 e 5: Capacidade de LLPS da DDX3X inteira

Por fim, será avaliada a capacidade de LLPS e as propriedades físico-químicas dos condensados formados pela hDDX3X inteira. Para isso, serão simuladas dezenas ou até centenas de cópias da hDDX3X inteira numa caixa de simulação simultaneamente. A forma selvagem e ao menos um mutante patogênico serão comparados.

Bimestre 6: Elaboração de relatório científico e artigo

Período dedicado à elaboração de relatório e de eventuais artigos científicos.

6. Referências

1. TRIVEDI, Rakesh; NAGARAJARAM, Hampapathalu Adimurthy. Intrinsically disordered proteins: an overview. International journal of molecular sciences, v. 23, n. 22, p. 14050, 2022.
2. IBRAHIM, Ayyam I. et al. Intrinsically disordered regions that drive phase separation form a robustly distinct protein class. Biophysical Journal, v. 122, n. 3, p. 207a, 2023.
3. E SILVA, Ivan Rosa; SMETANA, Juliana Helena Costa; DE OLIVEIRA, Juliana Ferreira. A comprehensive review on DDX3X liquid phase condensation in health and neurodevelopmental disorders. International Journal of Biological Macromolecules, v. 259, p. 129330, 2024.
4. WANG, Liguang et al. Martini3-IDP: improved Martini 3 force field for disordered proteins. Nature Communications, v. 16, n. 1, p. 1-14, 2025.