



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

“CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA DE LA PROTEÍNA Dpr DE *Streptococcus mutans* IMPLICADA EN LA FORMACIÓN DE CARIES DENTAL”

LIMA – PERÚ

2014

Resumen

Objetivo: Realizar la caracterización *in silico* de la proteína Dpr de *Streptococcus mutans* relacionada con su tolerancia al daño oxidativo durante la formación de caries dental humana.

Material y métodos: Se empleó la secuencia aminoacídica de la proteína Dpr de *S. mutans* cepa GS-5 obtenida a partir de la base de datos del GenBank (código de acceso BAA96472.1), la cual fue utilizada para la determinación de sus parámetros bioquímicos, dominios conservados, predicción de estructuras secundarias, modelamiento por homología y la predicción del patrón de interacción entre proteínas empleando las herramientas bioinformáticas ProtParam, Prosite, PHD Secondary Structure Prediction, SWISS-MODEL y STRING respectivamente. La visualización de modelos tridimensionales se realizó empleando PyMol. **Resultados:** La proteína Dpr de *S. mutans* es una molécula ácida y de bajo peso molecular y además presenta un dominio altamente conservado involucrado en la unión al hierro. A partir de la predicción de su estructura tridimensional, la proteína Dpr presenta una conformación dodecamérica que estaría implicada en su alta afinidad por hierro así como por otros iones divalentes. De la red de interacción, se tomó un score superior o igual 0.636 y se determinó la relación filogenética entre la proteína a Dpr con *ahpc*, *sodA*, *recA* y *clpC*, con identidades de homología de 61.3%, 61.9%, 61.1%, 55% respectivamente. **Conclusión:** La proteína Dpr de *S. mutans* resulta importante para el proceso infectivo de esta bacteria la cual debe generar una variedad de estrategias para la inhibición de la colonización de la cavidad bucal.

Palabras claves: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, Dpr, *in silico*.

Abstract

Objective: To perform an *in silico* characterization of the Dpr protein from *Streptococcus mutans* which is related to its tolerance to oxidative damage during formation of dental caries.

Material and methods: The amino acid sequence of Dpr protein from *S. mutans* strain GS-5 was obtained from GenBank database (accession number BAA96472.1). This sequence was used to the determination of biochemical parameters, conserved domains, secondary structure prediction and homology modelling, by means of ProtParam, Prosite, PHD Secondary Structure Prediction and SWISS-MODEL bioinformatics tools, respectively. Visualization of tridimensional models was performed under PyMol. **Results:** Dpr protein from *S. mutans* is an acid protein with a low molecular weight and also shows a highly conserved domain related to iron binding. Using predicted tridimensional structure, it was shown that Dpr has a dodecameric conformation which will be implied in its high affinity to iron as well as other divalent ions. **Conclusion:** Dpr protein from *S. mutans* is an important factor related to the infective process of *S. mutans*, which may allow the development of novel strategies to inhibit the colonization inside oral cavity.

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, Dpr, *in silico*.

Introducción

La caries dental es considerada en la actualidad como una enfermedad ecológica y multifactorial en lugar de una enfermedad estrictamente microbiana [1], la cual está asociada a la pérdida gradual, progresiva y neta de los dientes, que afecta a diferentes grupos de personas, principalmente niños y adultos jóvenes. Además, esta condición se caracteriza principalmente por la destrucción de los tejidos dentarios como resultado de la desmineralización provocada por los ácidos generados por la placa bacteriana [1,2].

Esta enfermedad infecciosa oral es causada por un grupo de bacteria que se encuentran relacionadas con la formación de placas de biofilm y su posterior efecto cariogénico. En periodos tempranos de la infección se encuentran *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces* sp., colonizadores primarios de la superficie dental, que otorgan mayor soporte de adherencia a los siguientes colonizadores como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus spp*, causantes de la acidificación del medio así como la desmineralización del esmalte dental [2].

Particularmente dentro de los principales agentes etiológicos causales se encuentra *Streptococcus mutans*, bacteria gram-positiva acidogénica y anaeróbica facultativa, cuya supervivencia y proliferación dentro de la cavidad bucal depende de diversos factores de virulencia, como su capacidad para metabolizar azúcares de los alimentos, principalmente sucrosa [3]; así como también su capacidad para formar biopelículas en la superficie de las piezas dentarias. Debido a la capacidad de adherirse a diversas superficies de las mucosas, *S. mutans* también es considerada como causante de la endocarditis bacteriana, además por presentar diferentes propiedades de adherencia en un tipo celular u otro, puede ayudar a determinar los agentes etiológicos en la mayoría de infecciones de cualquier sitio anatómico [4,5].

Para la dilucidación del mecanismo infeccioso y resistencia a los agentes oxidantes de la cavidad bucal, se emplea la combinación de técnicas de biología molecular, proteómica, inmunológica y otras áreas complementaria como la bioinformática estructural [6].

La formación de biopelículas de *S. mutans* para que se produzca la infección es un proceso secuencial, inicia con un paso crucial, la colonización de grupos de bacterias llamadas "colonizadores pioneros", entre los cuales se encuentran *S. gordonii*, *S. sanguinis* y *S. mitis*. El crecimiento de los primeros colonizadores, modifican el entorno y permite el crecimiento de los colonizadores tardíos como *S. mutans*. En este contexto, nosotros hemos centrado nuestro interés en el conocimiento del amplio espectro de proteínas expresadas por *S. mutans*, involucradas en el desarrollo de la caries, especialmente en la proteína Dpr (del inglés *Dps-like peroxide resistance gen*), la cual es considerada como una proteína de unión a hierro de ubicación intracelular y que le permite tolerar la acción tóxica del peróxido de hidrógeno. De esta manera se garantiza la supervivencia de dicha bacteria frente a otras potenciales colonizadoras de la cavidad bucal [7].

Por esta razón, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo caracterizar a la proteína Dpr utilizando herramientas bioinformáticas *in silico* de tal forma que podamos contar con información a nivel de su estructura primaria, secundaria y terciaria, y así proponer estrategias novedosas para inhibir y/o bloquear el proceso de la formación de biopelículas bacterianas causantes de la caries dental.

Materiales y métodos

Obtención de la secuencia aminoacídica de la proteína Dpr

La secuencia primaria correspondiente a la proteína Dpr de *Streptococcus mutans* cepa GS-5 fue obtenida a través de la base de datos del GenBank (código de acceso BAA96472.1) [8]. Dicha secuencia fue utilizada para las posteriores predicciones *in silico* y obtención de la información estructural de dicha proteína.

Determinación de parámetros bioquímicos y dominios conservados

Para determinar los principales parámetros bioquímicos de la proteína Dpr se empleó la herramienta ProtParam del ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) [9], mientras que los dominios conservados presentes en dicha proteína fueron analizados mediante la herramienta Prosite del ExPASy (<http://prosite.expasy.org/>) [10].

Predicción de estructuras secundarias y alineamiento estructural

El análisis de predicción de estructuras secundarias presentes en la proteína Dpr de *S. mutans* fue realizada empleando la herramienta PHD Secondary Structure Prediction Method (<http://npsa-prabi.ibcp.fr>) [11]. Por otro lado, el alineamiento estructural se realizó en la plataforma Cn3D (versión 4.3.1) utilizando como molde a la proteína Dpr de *S. pyogenes* [12].

Modelamiento por homología

El modelo tridimensional de la proteína Dpr de *S. mutans* se obtuvo empleando la herramienta SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) [13], a partir de la información depositada en la base de datos del Protein Data Bank. La visualización del modelo obtenido se realizó empleando el programa PyMol Molecular Graphics System (versión 1.3).

Predicción de la interacción proteica

La red de interacción de proteínas se obtuvo usando el programa STRING [14]

Resultados

Del análisis de la secuencia primaria de la proteína Dpr de *S. mutans* se obtuvieron un total de 175 aminoácidos correspondientes a una proteína de 19.6 kDa con un punto isoeléctrico de 4.67 y una proporción de 28 aminoácidos ácidos versus 14 aminoácidos básicos. Esto define a Dpr como una proteína ácida de bajo molecular. Por otro lado, se observó la presencia de un dominio conservado correspondiente a la familia de proteínas Dps (del inglés *DNA-binding protein from starved cells*), superfamilia de proteínas ferritinas, y que está compuesto de la secuencia aminoacídica 50-HWYMRGSGFLYLHPKMD-66 (Fig. 1).

Con respecto a su estructura secundaria, esta proteína es rica en hélices α (62.82%) y presenta una proporción menor de láminas β (9.71%). Del alineamiento estructural se obtuvo una homología del 76% a nivel de su secuencia de aminoácidos con la proteína Dpr de *S. pyogenes*, lo cual muestra un alto nivel de conservación en su estructura tridimensional (Fig. 2), mientras que el modelamiento por homología mostró que la proteína Dpr de *S. mutans* presenta estructura dodecamérica, cuyo monómeros presentan extremos N- y C-terminal altamente hidrofóbicos (Fig. 3).

De la red de interacción, tomando un score superior o igual 0.636, se determinó con una identidad del 61.9 % la relación filogenética con la enzima sodA y 61.3% con ahpc; no se observó una coexpresión de los genes de las proteínas Dpr (Fig. 4).

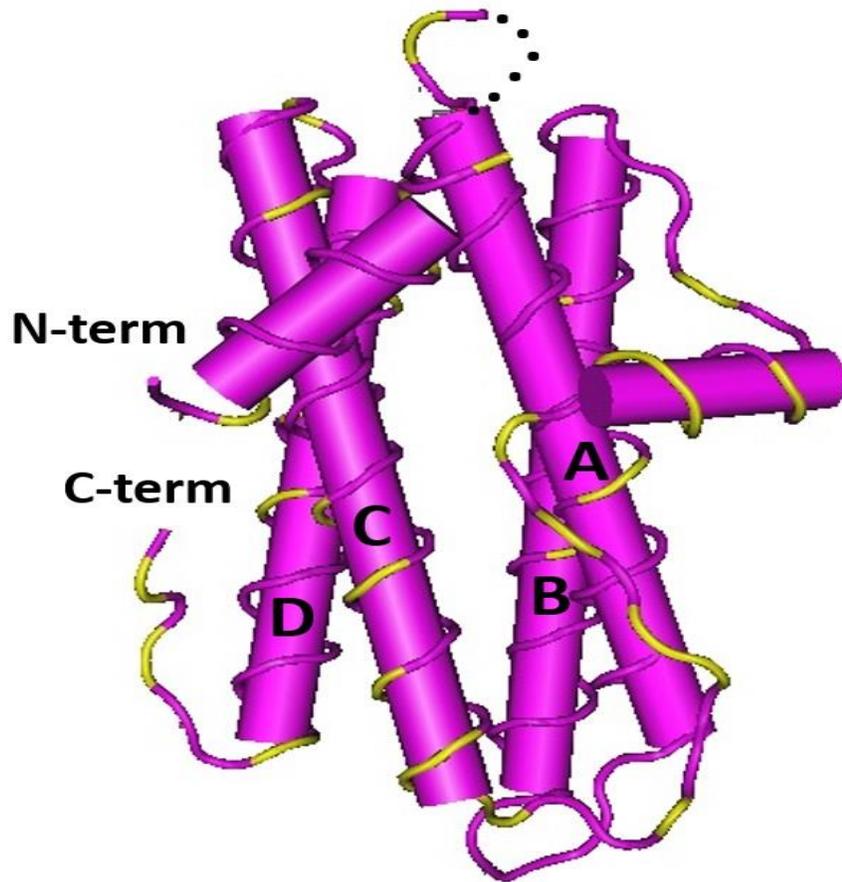


Fig. 2. Alineamiento estructural de las proteínas Dpr de *S. mutans* y *S. pyogenes*. Se observan las regiones A, B, C y D, así como las porciones que corresponde a aminoácidos no conservados (amarillo).



Fig. 3. Modelo tridimensional de la proteína Dpr de *S. mutans*. Se muestra la estructura dodecamérica de la proteína así como los posibles sitios de unión al hierro.

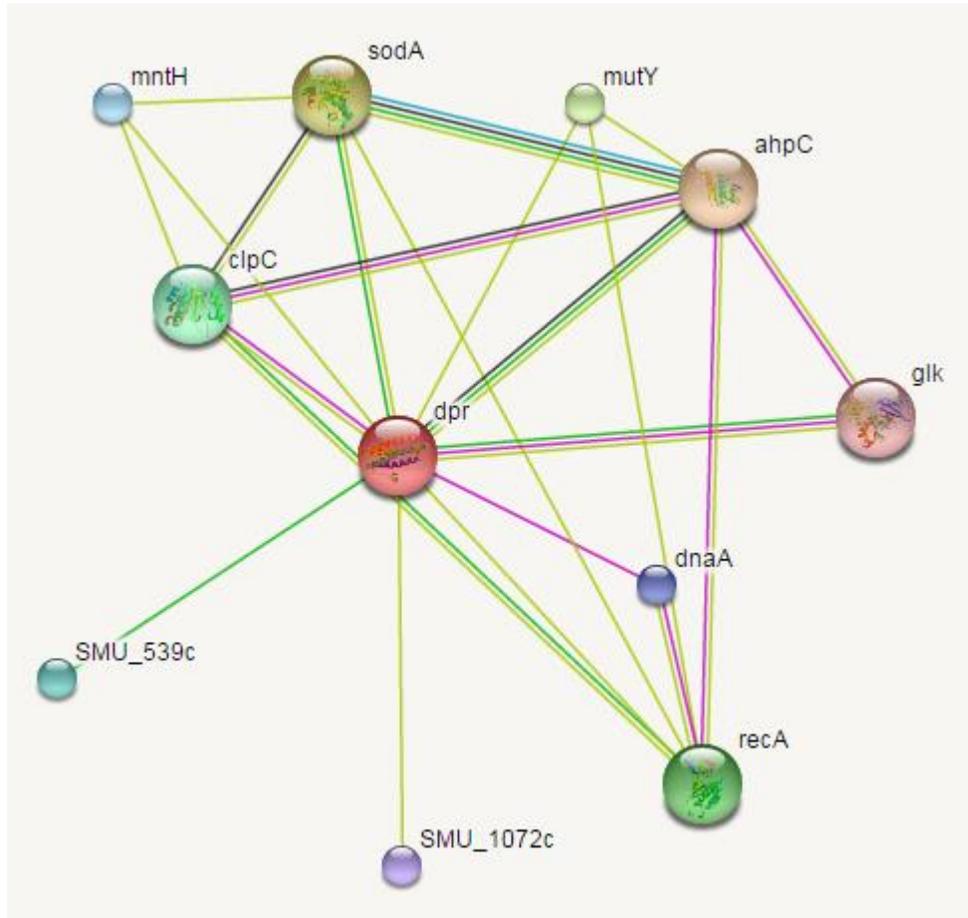


Fig. 4 Red de interacción de la proteína Dpr de *S. mutans* con las proteínas ahpc, sodA, recA y clpC con identidades de homología de 61.3%, 61.9%, 61,1%, 55% respectivamente.

Discusión

En el presente artículo se han determinado las principales características *in silico* de la proteína Dpr de *Streptococcus mutans*. En estudios previos, se ha demostrado que Dpr es una proteína de unión al hierro similar a ferritina, la cual está vinculada con la aerotolerancia de *S. mutans*, convirtiéndose en una proteína esencial para la sobrevivencia de esta bacteria [7,8]. Con respecto a su estructura primaria y secundaria, se encuentra que esta proteína es de naturaleza ácida y de bajo peso molecular, mientras que con respecto a su estructura tridimensional, esta proteína presenta una conformación dodecamérica, donde cada monómero está compuesto de 4 hélices α . Este hallazgo es corroborado por ensayos de microscopía electrónica, los cuales muestran que Dpr presenta una estructura esférica con una alta afinidad por el hierro, y cuyo diámetro es muy semejante al de otras proteínas de la familia Dps [8].

Para que una célula pueda sobrevivir en un medio aeróbico, es importante que éstas cuenten con un sistema de adaptación a la presencia de oxígeno. Sin embargo, cuando esta molécula está presente a concentraciones mayores que las normales se producen derivados conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS) entre los que se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el radical superóxido ($O^{2\cdot-}$), las cuales pueden potencialmente dañar el ADN de las células y pueden formar complejos con el hierro a través de la reacción de Fenton [15]. Por esta razón, la expresión de proteínas Dpr en bacterias como *Streptococcus mutans* es inducida en medios aeróbicos, lo cual garantizaría su supervivencia en estas condiciones [8]. En este sentido, nuestros resultados confirman la presencia del dominio conservado de la proteína Dpr de *S. mutans*, el cual está conformado por la familia Dps cristalizada de *Streptococcus pyogenes*, está conformado por 17 residuos de aminoácidos que comprenden la secuencia 50-HWYMRGSGFLYLHPKMD-66, de los cuales siete de éstos: H⁵⁰, G⁵⁵, F⁵⁸ y H⁶² son altamente conservados y también se encuentran las proteínas Dpr de *Streptococcus pyogenes* y *Listeria innocua* [12]. Así mismo, mediante espectrometría de masas se ha logrado identificar que las proteínas Dpr se unen además otros iones divalentes como el Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ y Mo²⁺, donde cada subunidad puede albergar hasta 40 átomos de estos iones. Siendo estos iones importantes para la estabilidad de las proteínas Dpr, esto motivaría a generar una estrategia de inhibición de estas bacterias mediante el empleo de

agentes quelantes que interfieran con la capacidad aerotolerante de *S. mutans*, logrando así reducir su colonización de la cavidad bucal.

La predicción de patrones de redes de interacción permite visualizar de manera precisa la relación filogenética, co-expresión de genes y proteínas relacionadas en algunas u otras especies. En nuestro resultado cuando se observa el Gene Neighborhood, los genes ortólogos en diferentes organismos se ubican repetidamente y se localizan cercanamente entre ellas y existe una homología con más del 50% entre la proteína Dpr-ahpc y Dpr-sodA, es decir que estas proteínas se encuentran altamente conservadas [15]. No se observó una coexpresión de los genes de las proteínas Dpr, pero sí de proteínas ortólogas como Dps y ahpc relacionadas con Dpr entre *S. mutans* y *Campylobacter jejuni* y un reporte experimental de las proteínas Dps y clpA con un alto grado de score. Además existe una semejanza funcional entre estas tres proteínas, ya que todas por diferentes mecanismos protegen a la célula del estrés oxidativo.

Como parte del evidencia experimental de la función de la proteína Dpr y su relación con la proteasa ClpC, esta interacción radica en que la proteasa ClpC regula el evento de la patogenicidad por medio de genes *Spx* [17].

Conclusiones

La proteína Dpr de *Streptococcus mutans* es una proteína ácida de bajo peso molecular y que presenta dominios de unión al hierro, la cual contribuye a la aerotolerancia de la bacteria en la cavidad bucal y presenta una red de interacción limitada a la superfamilia de las ferritinas y proteínas funcionalmente similares que protegen contra el estrés oxidativo.

Literatura citada

1. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006;6 Suppl 1:S14.
2. Ding Y, Wang W, Fan M, Tong Z, Kuang R, Jiang W, et al. Antimicrobial and anti-biofilm effect of Bac8c on major bacteria associated with dental caries and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides*. 2014;52:61-7.
3. Kuramitsu HK, Wang BY. Virulence properties of cariogenic bacteria. *BMC Oral Health*. 2006 Jun 15;6 Suppl 1:S11.
4. Gould K, Ramirez-Ronda CH, Holmes RK, Sanford JP. Adherence of bacteria to heart valves in vitro. *J Clin Invest*. 1975 Dec;56(6):1364-70.
5. Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol*. 2006 Aug;55(Pt 8):1135-40.
6. Black C, Allan I, Ford SK, Wilson M, McNab R. Biofilm-specific surface properties and protein expression in oral *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol*. 2004 Apr;49(4):295-304.
7. Yoshida A, Niki M, Yamamoto Y, Yasunaga A, Ansai T. Proteome analysis identifies the Dpr protein of *Streptococcus mutans* as an important factor in the presence of early Streptococcal colonizers of tooth surfaces. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121176.
8. Yamamoto Y, Higuchi M, Poole LB, Kamio Y. Role of the dpr product in oxygen tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2000;182(13):3740-7.
9. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editor. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press; 2005. p. 571-607.
10. de Castro E, Sigrist CJ, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W362-5.
11. Rost B, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol*. 1993 Jul 20;232(2):584-99.

12. Haikarainen T, Tsou CC, Wu JJ, Papageorgiou AC. Crystal structures of *Streptococcus pyogenes* Dpr reveal a dodecameric iron-binding protein with a ferroxidase site. *J Biol Inorg Chem*. 2010 Feb;15(2):183-94.
13. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul;42(Web Server issue):W252-8.
14. Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, Simonovic, N., Roth, A., Santos, A., Tsafou, KP., Kuhn, M. Bork, P., Jensen, LJ., von Mering, C. (2014). STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*, gku1003.
15. Kassem, I. I., Khatri, M., Sanad, Y. M., Wolboldt, M., Saif, Y. M., Olson, J. W., & Rajashekara, G. (2014). The impairment of methylmenaquinol: fumarate reductase affects hydrogen peroxide susceptibility and accumulation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiologyopen*, 3(2), 168-181.
16. Kajfasz, J. K., Rivera-Ramos, I., Abranches, J., Martinez, A. R., Rosalen, P. L., Derr, A., Quivey, R. & Lemos, J. A. (2010). Two Spx proteins modulate stress tolerance, survival, and virulence in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 192(10), 2546-2556.