



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

“ANÁLISIS DE DOCKING MOLECULAR DE LA ENZIMA SORTASA A DE *Streptococcus mutans* Y SU INTERACCIÓN CON EL FLAVONOIDE CHALCONA”

LIMA-PERÚ

2016

ANÁLISIS DE DOCKING MOLECULAR DE LA ENZIMA SORTASA A DE *Streptococcus mutans* Y SU INTERACCIÓN CON EL FLANOVOIDE CHALCONA

RESUMEN

Objetivo: Determinar la interacción in silico, mediante Docking Molecular con la finalidad de hacer mucho más específicas estas interacciones para futuras alternativas de terapias anti infecciosas. **Material y métodos:** Para este fin, se obtuvo la secuencia aminoacídica de la proteína de tipo silvestre SrtA de *S. mutans* (Q8CM62) se obtuvo utilizando la base de datos de UniProt. A partir de estas secuencias se determinaron sus principales parámetros bioquímicos, residuos conservados, predicción de estructuras secundarias así como modelos de homología, empleando las herramientas ProtParam, Clustal Omega, PHD Secondary Structure Prediction y SWISS-MODEL respectivamente. Además, el docking molecular y la red de interacción de proteínas fueron determinados usando SwissDock y STRING. Para el análisis filogenético se utilizó el método G-INS-1 empleando la interfaz MAFFT 7. **Resultados:** se determinó que la secuencia de aminoácidos de SrtA de *S. mutans* presenta 206 aminoácidos, con un peso molecular de 22.71KDa y un punto isoeléctrico de 9.01. Del alineamiento múltiple, se encontró una triada de residuos catalíticos altamente conservadas entre las enzimas sortasas, caracterizadas por los residuos Cys²⁰⁵, His¹³⁹, Arg²¹³. De la predicción de su estructura secundaria, se determinó que su conformación presenta 30.49% de alfa hélices y 26.42% de láminas beta, siendo su estructura tridimensional del tipo mixta (alpha-beta). Del modelado de la secuencia SrtA wild type, con un 99.51% de identidad con la secuencia Sortasa A mutante (H139A), se observó que no existe cambio estructural ni funcional. Basados en los templados enzima-inhibidor obtenidos por docking molecular, se escogió el resultado con la menor energía ($\Delta G = -5.12$), en el que muestra la interacción espontánea entre la SrtA y chalcona. Entre las diferentes proteínas que están involucradas en la red como la SrtA, con un score superior o igual 0.651, encontramos a gyrA y ldh con valores de homología 50.3 % y 66,2% respectivamente. Finalmente, el árbol filogenético G-INS-1 generado, mostró una alta conservación de esta enzima (SrtA) en las bacterias Gram positivas. **Conclusión:** La enzima Sortasa A wild type de *Streptococcus mutans*, es una biomolécula básica de bajo peso molecular, con una alta conservación de su dominio catalítico que interactúa específicamente con el flavonide chalcona; lo cual representa una importancia terapéutica en la salud oral.

Palabras claves: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, SrtA.

INTRODUCCIÓN

La caries dental en humanos aún sigue siendo un problema de salud pública importante, teniendo como causante etiológico primario a *S. mutans*. La particular característica infectiva de esta bacteria Gram positiva, al cual se debe la resistencia al tratamiento con antibióticos es la cuya particular eficiencia infectiva está basado en la formación de biopelículas sobre tejidos duros de la cavidad oral. Uno de los principales pasos para la adhesión de *S. mutans* a las superficies dentales es la formación de biopelículas, el cual hace efectiva su permanencia en la cavidad oral, garantizando la infección cariocidental (1).

El organismo para procurar la adhesión, expresa una serie de componentes proteicos como proteínas de superficie (adhesinas) y proteínas catalíticas (enzimas) que efectúan la adhesión o el acoplamiento de las adhesinas a la superficie dental. De ahí que, la enzima Sortasa A, tiene importancia ya que es una transpeptidasa que une covalentemente las proteínas de superficie a la superficie dental. El motivo conservado que reconoce esta enzima es LPXTGX ubicada en la zona C-terminal en todas las adhesinas para la respectiva escisión del enlace amida entre los residuos de treonina y glicina a través del residuo de cisteína altamente conservada de sitio activo (2, 3).

La enzima Sortasa A de *S. mutans* actualmente es considerado un blanco atractivo de inhibición para combatir la formación y progresión de la caries dental, ya que su rol patogénico en la unión de proteínas de superficie es de suma importancia. Productos naturales de planta como los flavonoides son los inhibidores más eficaces para la Sortasa A, ya que frena su actividad catalítica, inactivándola y evitando la formación de biopelículas y por ende de caries (3). Dentro de los flavonoides más estudiados e identificados están la rutina y la quercetina de *Sophora japónica* (4). Otros como el flavonoide curcumina, ingrediente activo de la cúrcuma, también presenta actividad anti-biofilm. La morina, flavonoide de muchas hierbas chinas y frutas, presenta un efecto inhibidor contra la formación de biopelículas (5). Los flavonoides trans-chalcona y cis-chalcona también presentan actividad inhibitoria.

Se evaluó que la chalcona que hace efectiva la dismiucion es l atranschalcona que es dependiente d ela concentración, a mayor concentración mayor dismunucion (6).

Por ello en esta investigación intentaremos demostrar la mayor interacción y afinidad enzima-inhibidor mediante Docking molecular, como complementación a futuras investigaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la secuencia aminoacídica de la enzima Sortasa A

Se realizó una búsqueda de la secuencia primaria correspondiente a la Sortasa A wild type de *Streptococcus mutans* de la base de datos del UniProt con código (Q8CM62) (7). A partir de cual se realizó un análisis bioinformático y se obtuvo la información estructural de la enzima.

Determinación de parámetros bioquímicos y dominios conservados

Para determinar los principales parámetros bioquímicos de la enzima Sortasa A se usó la herramienta ProtParam del ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) (8).

Predicción de estructuras secundarias y alineamiento estructural

Para determinar la predicción de estructuras secundarias presentes en la Sortasa A, se usó la herramienta PHD Secondary Structure Prediction Method (<http://npsa-prabi.ibcp.fr>) (9). Por otro lado, el alineamiento estructural se realizó en la plataforma Cn3D (versión 4.3.1) utilizando como molde a Sortase A mutante de *S. mutans* (PDB ID: 4TQX) (10).

Modelamiento por homología de la enzima Sortasa A wild type

Para obtener el modelo tridimensional de la enzima Sortasa A wild type de *S. mutans*, se empleó la herramienta SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) (11), a partir de la estructura tridimensional de la Sortasa A mutante de *S. mutans* depositada en la base de datos del Protein Data Bank (PDB ID: 4TQX.1). El modelo obtenido se visualizó a través del programa PyMol Molecular Graphics System (versión 1.3).

Análisis de docking molecular

El análisis de docking molecular del complejo enzima wild type SrtaA-inhibidor de *S. mutans*, fue realizada empleando la herramienta SwissDock (<http://www.swissdock.ch/docking>) (12).

RESULTADOS

La enzima en estudio presenta 206 aminoácidos, con un peso molecular de 22.71KDa y un punto isoeléctrico de 9.01 (Fig. 1). Del alineamiento, se encontró una triada de residuos catalíticos altamente conservadas entre las enzimas sortasas, caracterizadas por los residuos Cys²⁰⁵, His¹³⁹, Arg²¹³ (Fig. 2). A partir de la predicción de su estructura secundaria, se determinó que su conformación presenta 30.49% de alfa hélices y 26.42% de láminas beta, siendo su estructura tridimensional del tipo mixta (alpha-beta). Del modelado de la secuencia SortA wild type, con un 99.51% de identidad con la secuencia Sortasa A mutante (H139A), se observó que no existe cambio estructural ni funcional. De los templados enzima-inhibidor, obtenidos del Docking Molecular, se escogió el de menor energía ($\Delta G = -5.12$) (Fig.3). De la red de interacción de proteínas con un score superior o igual 0.651, se determinó con una identidad del 50.3 % la relación filogenética con la enzima *gyrA* y 66,2% con *ldh* (Fig. 4). Finalmente, el árbol filogenético G-INS-1 generado, mostró una alta conservación en las bacterias Gram positivas (Fig. 5).

	N° amino acids	MW	pI	N° amino acids	N° amino basic
wild type	246	27.5 Kda	9.69	21	33
mutante	206	22.7 Kda	9.01	20	24

Fig. 1. Se muestra las comparaciones de los parámetros bioquímicos de la Sortasa A mutante Miss H139A y de tipo salvaje (Q8CM62).

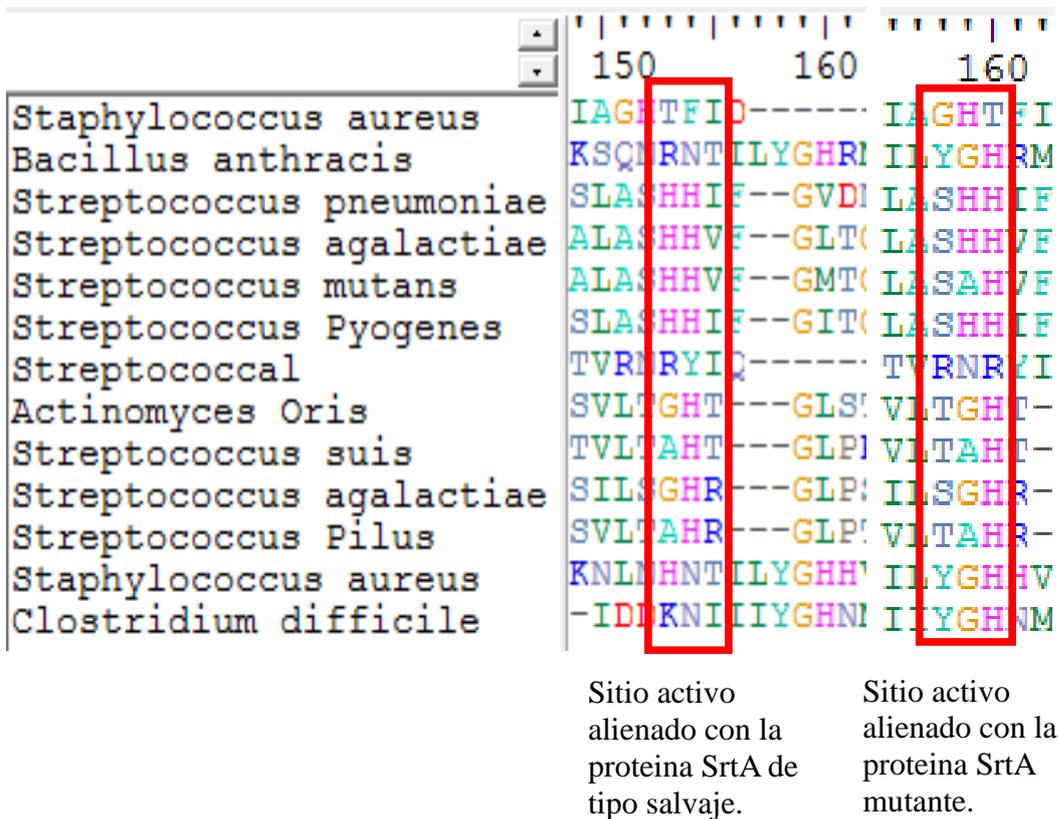


Fig. 2. Usando Clustal Omega, ambas secuencias fueron alineadas y una tríada catalítica conservada fue encontrada y compuesta de Cys205, His139 y Arg213 residuos, que al altamente conservado entre otros sortases de bacterias gramnegativas .

Swissdock



Chimera 1.11

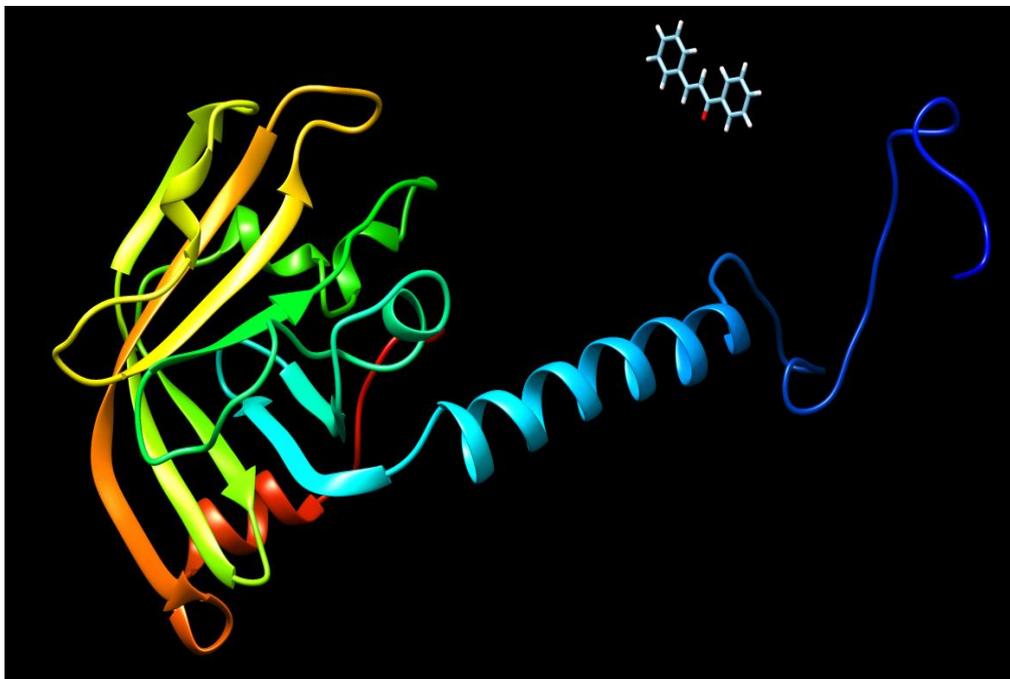


Fig. 3 De los resultados de diversos modelos aproximados obtenidos por el dockig molecular, se escogió el modelo con la energía libre mas bajo ($\Delta G = -5,12$ kcal/mol). Esto demuestra que existe una interacción espontánea entre el tipo la SrtA de tipo salvaje y la molécula trans-chalcona. Esta interacción también fue determinada y visualizada usando Chimera 1.11

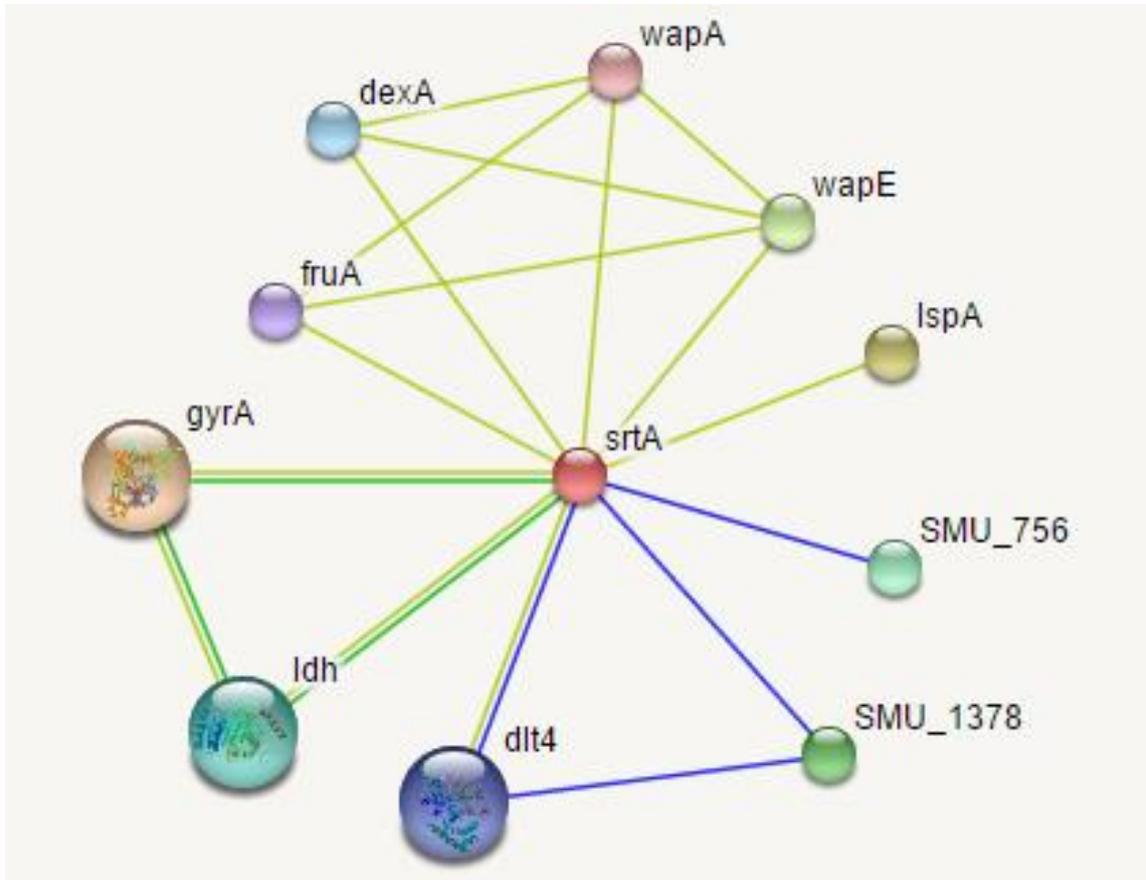


Fig. 4 Se evaluó la colocación de la proteína SrtA y se obtuvo que interactuaba con las proteínas gyrA y LDH, con residuos conservados de 50,3% y 66,2%, respectivamente.

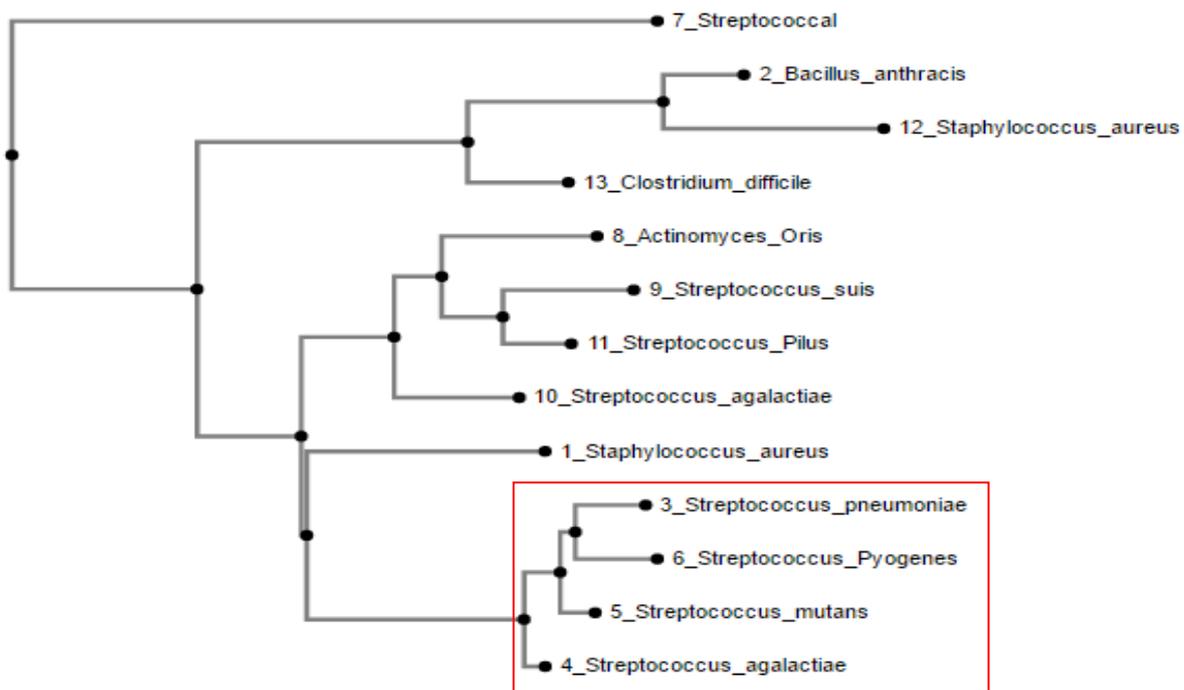


Fig. 5 Análisis filogenético de la proteína SrtA de tipo salvaje (Q8CM62) en el que se muestra una clado separado de la familia streptococo debido a la conservación de sus secuencias proteicas.

DISCUSIÓN

En el presente proyecto de investigación se ha realizado el análisis bioinformático y el docking molecular de la enzima *Sortasa A de Streptococcus mutans*. Sortases son una familia de enzimas catalogadas como transpeptidasas asociadas a la membrana celular y se conservan altamente en bacterias Gram-positivas (13). Existen diferentes isoformas de sortase (Srta., B, C) responsables de la adhesión bacteriana a la superficie de la célula huésped, el secuestro de hierro, la formación de biofilm, la construcción de Pili, la formación de la pared celular, la invasión bacteriana y la señalización (14). Sortase a (SaSrtA) era la primera isoforma identificada en el estafilococo áureo por Schneewind et.al., que también dilucidated los mecanismos catalíticos de esta enzima (15).

El docking molecular demuestra que la asociación ligando-proteína presenta una j baja energía de interacción, por lo que se puede validar experimentalmente; ya que el estado dinámico de interacción y energía de unión evalúa aquellos compuestos que son más activos dentro del pocket del sitio catalítico y que estos compuestos en validaciones experimentales sobrevivirán como mejores inhibidores del mecanismo de adhesión celular de Ba-SrtA y la actividad de inhibición de la adhesión celular (16).

La Sortasa A, cala dentro de estos blancos terapéuticos, es una enzima transpeptidasa que cataliza el anclaje de importantes factores virulentos ubicados en la pared de bacterias Gram Positivas al tejido dentario y por ende relacionado directamente a la formación del Biofilm; de ahí su importancia para el estudio de nuevas terapias anti infecciosas.

CONCLUSIÓN

La proteína Sortasa A de *Streptococcus mutans* es una molécula básica que interactúa específicamente con flavonoides chalcon que se considera de relevancia médica para la salud bucal..

LITERATURA CITADA

1. Ahn, S. J., Ahn, S. J., Wen, Z. T., Brady, L. J., & Burne, R. A. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infection and immunity*, 76(9), 4259-4268.
2. Lee, S. F., & Boran, T. L. (2003). Roles of sortase in surface expression of the major protein adhesin P1, saliva-induced aggregation and adherence, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity*, 71(2), 676-681.
3. Wallock-Richards, D. J., Marles-Wright, J., Clarke, D. J., Maitra, A., Dodds, M., Hanley, B., & Campopiano, D. J. (2015). Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone. *Chemical communications*, 51(52), 10483-10485.
4. Yang, W. Y., Ahn, C. H., & Shin, J. (2016). Flavonoid Glycosides Inhibit Sortase A and Sortase A-Mediated Aggregation of *Streptococcus mutans*, an Oral Bacterium Responsible for Human Dental Caries. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(9), 1566-1569.
5. Huang, P., Hu, P., Zhou, S. Y., Li, Q., & Chen, W. M. (2014). Morin inhibits sortase A and subsequent biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Current microbiology*, 68(1), 47-52.
6. Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., & Trentin, D. S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical Reviews*, 116(16), 9162-9236.
7. 1.- Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 29;99(22):14434-9.
8. 2.- 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.
9. 3.- Rost B, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol*. 1993 Jul 20;232(2):584- 99.
10. 4.- Wallock-Richards, D. J., Marles-Wright, J., Clarke, D. J., Maitra, A., Dodds, M., Hanley, B., & Campopiano, D. J. (2015). Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone. *Chemical communications*, 51(52), 10483-10485.

11. 5.- 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.
12. 6.- Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic acids research*, 39(suppl 2), W270-W277.
13. Wallock-Richards, D. J., Marles-Wright, J., Clarke, D. J., Maitra, A., Dodds, M., Hanley, B., & Campopiano, D. J. Molecular basis of *Streptococcus mutans* sortase A inhibition by the flavonoid natural product trans-chalcone. *Chemical communications*, 2015, 51(52), 10483-10485.
14. T. Spirig, E. M. Weiner and R. T. Clubb, *Mol. Microbiol.*, 2011, 82, 1044–1059.
15. Y. Zong, T. W. Bice, H. Ton-That, O. Schneewind and S. V. Narayana, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 31383–31389.
16. Selvaraj, C., & Singh, S. K. (2014). Validation of potential inhibitors for SrtA against *Bacillus anthracis* by combined approach of ligand-based and molecular dynamics simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 32(8), 1333-1349.