

# MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA COVR DA *STREPTOCOCCUS MUTANS*: UM PROMISSOR ALVO CONTRA CARIOGÊNESE HUMANA

Nelson Alberto Nascimento de ALENCAR

ALENCAR, Nelson Alberto Nascimento de. **Modelagem molecular da proteína CovR da *streptococcusmutans*: um promissor alvo contra cariogênese humana.** Projeto de investigação científica do Curso de Farmácia – Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA), Belém, 2014.

Este projeto objetivou utilizar técnicas de bioinformática e homologia molecular para construir *in silico* o modelo tridimensional da proteína CovR da espécie *Streptococcusmutans* S.m (UA159) e estudar as interações entre substratos e fármacos promissores. O S.m possui morfologia ovalada, podendo agrupar-se em pares ou cadeias. É o principal patógeno da cárie dental em humanos, por ser capaz de se acumular no biofilme dentário principalmente na presença de sacarose, produzir e tolerar grandes concentrações de ácidos, os quais causam a desmineralização. Muitos estudos têm demonstrado que o S.m é comumente

associado à Endocardite Bacteriana subaguda, devido, possivelmente, às dificuldades de isolamento e identificação dessa bactéria em organismos vivos. O patógeno expressa diversas proteínas de superfície envolvidas na adesão e acúmulo bacteriano em biofilmes. Essas incluem as glucosiltransferases, as quais sintetizam glucanos extracelulares a partir da sacarose, e as ligantes de glucano. Em *S.m*, a proteína CovR regula diversos genes envolvidos na formação de biofilmes, na biossíntese do envelope celular e a resposta a estresses. Para uma bactéria se adaptar e sobreviver deve adquirir informações dos fluxos vindos do ambiente circundante, que consistem de sinais produzidos por alterações no pH, intensidade de luz, osmolaridade, concentração de moléculas pequenas, etc. Bactérias têm sistemas moleculares evoluídos e especializados para a transmissão desses sinais para a célula e desencadear uma resposta causando alterações nos níveis de genes-alvo de. A cárie, devido à sua origem microbiana, pode variar de intensidade e prevalência de acordo com as condições de cada hospedeiro, como o fluxo e a capacidade tampão da saliva, presença de imunoglobulinas salivares e fatores

exógenos, como a dieta e higiene bucal (LOESCHE, 1986; BABIERI, 2005; MOREIRA, 2006). Para causar infecção ou sobreviver na cavidade bucal, os microrganismos precisam aderir-se às superfícies, ou então serão removidos pelo contínuo fluxo salivar. Durante seu processo evolutivo, o *S.m* desenvolveu fatores que determinam sua cariogenicidade ou virulência, como o sistema enzimático para o metabolismo da sacarose, substância mais cariogênica. Atualmente, foi demonstrado que o *S.m* induz cárie quando implantado em modelos animais experimentais. Observa-se, entretanto, que cáries obtidas com a participação da bactéria e da microbiota normal da boca são mais extensas e frequentes do que só com *S.m*, demonstrando, assim, a participação efetiva da microbiota bucal na etiologia da doença (BRATTHALL & CARLSON, 1985). O genoma da cepa de *S.m*UA159 contém pelo menos 13 sistemas de transdução de sinal de dois componentes (SDC) completos, além disso, um Regulador de Resposta (RR) órfão, designado como CovR (controle da virulência), devido à sua alta similaridade com o RR do SDC. CovSR, um dos mais estudados SDC das

espécies patogênicas *Streptococcus pyogenes* (GAS) e *Streptococcus galactiae* (GBS) (CHONG *et al.*, 2008). Em *S.m*, CovR reprime diretamente genes importantes para a síntese e interação com glucano, um componente importante da matriz do biofilme. Esses incluem *gtfB/C*, *gbpB/C*, que codificam respectivamente glucosiltransferase B e C, proteína ligadora de glucano B (GbpB) e proteína ligadora de glucano C (GbpC). Consistentemente, a inativação de CovR em *S.m* aumenta significativamente a formação de biofilmes na presença de sacarose. Os *S.m* têm sido encontrados em praticamente todos os indivíduos com alta, baixa ou muito baixa prevalência de cárie (CARLSSON, OLSSON & BRATTHALL, 1985). Porém a simples detecção desses microrganismos na saliva ou biofilme não justifica o desenvolvimento de cárie, devendo-se levar em consideração a concepção da natureza multifatorial da doença, a qual apresenta variações de acordo com as condições socioeconômicas, culturais e ambientais de uma população (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001; BRATTHALL, 1992). A progressão da doença cárie depende de hospedeiro suscetível, microbiota

patogênica e dieta rica em carboidratos, interagindo em condições críticas num determinado período de tempo. Desse modo a predição teórica da estrutura tridimensional da CovR é de suma importância para o estudo de sua inibição e tentativa de controle da patologia. No trabalho procedemos à identificação da(s) proteína(s) molde(s) apresentando sequência(s) primária(s) similar(es), realizada por meio de alinhamentos locais da proteína-alvo contra as sequências proteicas do Protein Data Bank (PDB); geramos o modelo tridimensional da proteína CovR da espécie *S.m* (UA159) por meio de homologia molecular; verificamos e analisamos os resultados obtidos entre a estrutura-alvo e a(s) estrutura(s) modelo(s); utilizamos diversos programas de validação sobre o modelo proposto; e previmos de modo completo o modelo Tridimensional da enzima CovR da espécie *S.m* (UA159). Para conseguir as estruturas que mais se assemelham à estrutura-alvo, foi usado o Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), Protein Data Base (PDB) e o SwissModeller. No alinhamento foi usado o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e o Clustalw. Para gerar o modelo teórico, foi usado o

modeller 9.13. A validação do modelo teórico foi feita por meio do molprobability. A sequência composta por 232 aa foi obtida no National Center for Biotechnology Information (NCBI) em formato FASTA, contendo a sequência primária de aminoácidos do regulador de resposta CovR (AJDIC *et al.*, 2002). Os números crescentes a respeito dos genes e das proteínas de muitos organismos proporcionaram o surgimento de inúmeros bancos de dados. Dentre os vários bancos de dados existentes, utilizamos o GenBank, UniProt, Protein Data Bank (PDB) e o PDBSum. O valor aceitável de similaridade na modelagem por homologia é acima de 25% da sequência entre proteína-molde e proteína-alvo. (D'ALFONSO *et al.*, 2001). O “e-value”, parâmetro estimado pelo BLAST, expressa a dificuldade para encontrar uma sequência perfeitamente idêntica, ou seja, quanto menor o valor, menor a chance de tal comparação ter sido encontrada por pura coincidência. Levamos em consideração para a análise do molde os valores de “score” e de resolução em Angstrom da difração por raio-X. Na modelagem por homologia, os valores significativos de “score” devem estar maiores

de 200 para esse programa. A construção de um modelo tridimensional (alvo) é feita por meio da utilização de uma estrutura molde, gerado depois de um alinhamento consistente entre ambas. A validação é uma etapa essencial, a qual pode ser executada em diferentes níveis de organização estrutural. Os softwares usados para avaliação dos modelos: PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1998) e o VERIFY3D (LUTHY *et al.*, 1992). A sequência primária do regulador CovR (NCBI ID NP721862) foi submetida ao processo de comparação no PDB contramoldes 3D resolvidos por cristalografia. Foram utilizados os PDB's 2A9O, 2D1V e o 4KNY(A). Os 117aa iniciais que formam o domínio N-Terminal da proteína mostraram uma identidade de 82,1% com o PDB 2A9O, o domínio C-terminal com 103aa apresentaram identidade de 76,5 com o PDB 2D1V, já PDB 4KNY que apresenta os dois domínios tem identidade com a CovR de 36%. Os PDBs foram alinhados com a CovR e gerados modelos por homologia comparativa. O modelo teórico apresentou bons resultados durante o processo de identificação de referências (2A9O e 21DV) e foram utilizados na geração do modelo da proteína CovR. A

sobreposição das estruturas-alvo com os moldes teve ótimos valores de RMS: os valores de RMSD para os modelos gerados a partir dos PDBs citados foram, respectivamente, de 0,081, 0,092 e 0,193. Os resíduos que compõem o sítio-ativo permaneceram inalterados no *CovR* de *S. mutans*, seguindo tendência evolutiva devido a sua importância na adaptação bacteriana. A maioria dos resíduos do modelo gerado foi encontrada ocupando as regiões mais favoráveis e os outros ocuparam outras regiões permitidas. O programa executa cálculos de energia em uma cadeia de proteína sendo possível determinar zonas de alta energia na proteína, as quais estão relacionadas a erros pontuais ou regiões de interação. As comparações apenas com as estruturas de *Streptococcus pneumoniae* e *Bacillus subtilis* não foram aspectos limitantes para o uso da modelagem por homologia, sabendo-se que essas proteínas são conservadas mesmo entre indivíduos de ordens diferentes, o que foi confirmado pela geração de um modelo com alto grau de identidade e qualidade em relação aos moldes resolvidos por cristalografia. Nenhuma mutação foi observada na sequência de aminoácidos que compõem

os resíduos do sítio ativo. Os modelos preditos por homologia apresentaram consistência com os modelos experimentais conhecidos e a estrutura da proteína CovR tende a ser conservada como nos outros reguladores de resposta. A estrutura tridimensional 4KNY (modelo completo), mesmo não tendo resultados tão consistentes quanto os das outras duas estruturas 2A9O e 2D1V, unindo os PDBs, obteve um modelo completamente confiável. Dessa forma, este trabalho demonstrou que a modelagem proteica por homologia é uma ferramenta útil para elucidação da estrutura 3D da *S. mutans*.

**Palavras-chave:** Modelagem molecular. Proteína COVR. Cariogênese humana.

## REFERÊNCIAS

BARBIERI, D.S.V. **Análise da aderência “in vitro” de *S. mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária.** Dissertação de Mestrado -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.p.92, 2005.

BRATTHALL, D. **Caries, views and perspectives.** Scand. J. Dent. Res., v.100, n.1, p.47-51, Feb.1992.

MATTOS-GRANER, R. O.; JIN, S.; KING, W. F.; CHEN, T.; SMITH, D. J.; DUNCAN, M. S. **Cloning of the Streptococcus mutans gene end coding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates.** *Infect. Immun.*, v.69, p.6931-6941, 2001.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de Streptococcus mutans em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80p., 2006.

CHONG, P.; L. DRAKE, I. **Biswas. Modulation of covR expression in Streptococcus mutans UA159.** *J. Bacteriol.*; v. 190, p.4478-4488, 2008.

LASKOWSKI R.A.; MACARTHUR M.W.; MOSS D.S. THORNTON J.M. **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.** *Journal of Applied Crystallography*, v.26, p.283-291, 1993.

LOESCHE, W.J. **Role of Streptococcus mutans in human dental decay.** *Microbiol. Rev.*, v.50, n.4, p. 353-380, 1986.

LÜTHY R.; BOWIE J.U.; EISENBERG D.; **Assessment of protein models with three-dimensional profiles.** *Nature*, 356, p. 83-5, 1992.

CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium streptococcus mutans in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Arch. Oral Biol.**, v.30, n.3, p.265-268, 1985.

AJDIĆ, D.; MCSHAN, W.M.; MCLAUGHLIN, R.E.; SAVIĆ, G.; CHANG, J.; CARSON, M.B., PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B.A.; FERRETTI, J.J. **Genome sequence of Streptococcus mutans UA159, a cariogenic dental pathogen.** Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 99, n. 22, 2002.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. **Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling.** Journal of Structural Biology. v.134, p. 246-256, 2001.