

# Modelación por homología de la proteína LuxS de *Porphyromonas gingivalis* cepa W83

## Modelling by homology of LuxS protein in *Porphyromonas gingivalis* strain W83

Díaz Caballero A<sup>1</sup>, Martínez Serrano E<sup>2</sup>, Vivas Reyes R<sup>3</sup>, Puerta Llerena L<sup>4</sup>, Méndez Cuadro D<sup>5</sup>,

Cabrales Salgado R<sup>6</sup>, Padilla Rodríguez A<sup>7</sup>

### RESUMEN

**Antecedentes:** En las proteínas no se logra siempre su cristalización, de buen tamaño y de buena calidad para someterla a difracción de rayos X. De tal manera que se abre un campo para el desarrollo de estudios teóricos moleculares y proteínicos, que permiten la representación de las moléculas en tres dimensiones, proporcionando una información espacial para estudiar la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares. **Materiales y Métodos:** Estudio *In silico*, a partir del análisis de secuencias primarias de seis diferentes proteínas LuxS cristalizadas de diversas bacterias, se seleccionó la proteína 1J6X del *Helicobacter pylori*, por su similitud con la secuencia de la proteína LuxS en *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) cepa W83, para producir un modelo por homología de esta proteína, utilizando los programas Sybyl y MOE. Se realizó un acoplamiento con el ligando natural para evaluar la reproducibilidad del modelo en un ambiente biológico. **Resultados:** Se desarrolló el modelado de la proteína LuxS de *P. gingivalis* cepa W83, que permite el acercamiento a una estructura que se propone, por la interacción entre la proteína y su ligando natural. El modelo generado con recursos computacionales logró una correcta estructura molecular que aceptó la realización de diversos cálculos. El acoplamiento demostró una cavidad donde se logran diversas posiciones del ligando con buenos resultados. **Conclusiones:** Se obtuvo un modelo 3D para la proteína LuxS en la *P. gingivalis* cepa W83 validado por diferentes métodos computacionales con una adecuada reproducibilidad biológica por medio del acoplamiento molecular.

**Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 5(3); 105-113, 2012.**

**Palabras clave:** Homología estructural de proteína, *Porphyromonas gingivalis*, conformación molecular, bacterias gram negativas, periodoncia (Decs Bireme).

### ABSTRACT

**Background:** Crystallization is not always achieved for all proteins in a good size and a good quality for X-ray diffraction. So that condition opens a field for the development of theoretical molecular and protein studies allowing the representation of the molecules in 3D, providing spatial information to study the interaction between ligands and macromolecular receptors. **Materials and Methods:** *In silico* study from primary sequence analysis of six different proteins LuxS crystallized of several bacteria. 1J6X protein of *Helicobacter pylori* was selected for its similarity with the LuxS protein sequence in *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) strain W83 to produce a homology model of this protein, using the Sybyl and MOE software. A docking was performed to assess the reproducibility of the model in a biological environment. **Results:** The LuxS protein modelling of *P. gingivalis* strain W83 was developed, which allows the approach to a proposed structure for the interaction between the protein and its natural ligand. The model generated with computational resources achieved the correct position and biological behavior by means of developed calculations. The docking showed a cavity in which the ligand adopted several positions with good results. **Conclusions:** A LuxS protein model was obtained, validated by different methods. This generated a 3D model for LuxS protein in *P. gingivalis* strain W83 with biological reproducibility by means of molecular docking.

**Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 5(3); 105-113, 2012.**

**Key words:** Protein structural homology, *Porphyromonas gingivalis*, molecular conformation, gram-negative bacteria, periodontic (Mesh Database).

1. Odontólogo. Universidad de Cartagena. Especialista en Periodoncia, Universidad Javeriana. Magister en Educación, Universidad del Norte. Candidato a Doctor en Ciencias Biomédicas, Universidad de Cartagena. Profesor Titular Universidad de Cartagena. Director Grupo de Investigaciones GITOUC. Colombia.

2. Químico. Universidad de Cartagena. Magister en Química, Universidad de Cartagena. Docente Universidad de Cartagena. Colombia.

3. Químico. Universidad del Valle. Magister en Química, Universidad del Valle. Doctor en Ciencias, Universidad Libre de Bruselas. Profesor Titular Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena. Director Grupo de Investigaciones Química Cuántica y Teórica. Colombia.

4. Químico Farmacéutico. Universidad de Cartagena. Magister en Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá. Doctor en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana. Profesor Titular, Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena. Colombia.

5. Químico Farmacéutico. Universidad de Cartagena. Magister en Biología, Universidad Javeriana. PhD en Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid. Profesor Asistente Universidad de Cartagena. Colombia.

6. Odontólogo. Universidad de Cartagena. DDS, PhD en Endodoncia, Universidad de São Paulo, Brasil. Profesor Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena. Colombia.

7. Químico. Universidad de Cartagena. Candidato a Magister en Química, Universidad de Cartagena. Consultora. Colombia.

**Correspondencia autor:** Antonio José Díaz Caballero. antoniodiazc@yahoo.com/adiacz1@unicartagena.edu.co. Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena. Campus de la Salud. Barrio Zaragocilla. Cartagena de Indias, Colombia. **Financiamiento:** Universidad de Cartagena. Trabajo recibido el 09/03/2012. Aprobado para su publicación el 26/07/2012.

## INTRODUCCIÓN

En el campo de la periodoncia moderna, no hay hasta la fecha una herramienta que de una solución adecuada para las enfermedades periodontales, diferentes a los tradicionales tratamientos mecánicos para la eliminación de los depósitos bacterianos que se vienen aplicando en odontología desde hace mucho tiempo<sup>(1,2)</sup>. Sigue siendo una gran incógnita el hallar un aspecto clave para impedir que bacterias como la *P. gingivalis* se asocien de manera efectiva en estructuras conocidas como biopelículas<sup>(3,4)</sup> y se produzcan los efectos dañinos sobre los tejidos periodontales<sup>(5)</sup>. Es por ello que el estudio de las proteínas que se asocian con las periodontitis viene tomando un gran auge en la actualidad, porque permite dar un paso hacia la solución de la enfermedad periodontal, buscando estrategias de control<sup>(6)</sup>. Por este motivo se propone adelantar estudios sobre las estructuras de las proteínas que se asocian con mecanismos tales como el quórum sensing y los fenómenos relacionados con las enfermedades periodontales, que propicien nuevas vías de investigación.

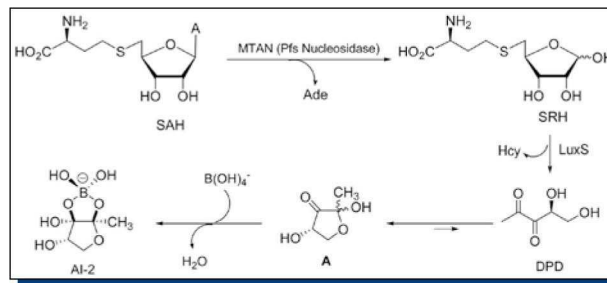
Conocer con exactitud la estructura de las proteínas es uno de los principales objetivos de la biología estructural y de la química computacional<sup>(7,8)</sup>. Para lograrlo es necesario la utilización de métodos proteómicos que faciliten el aislamiento, purificación, cristalización de las proteínas y el análisis por métodos de difracción de rayos X o de resonancia magnética nuclear (RMN)<sup>(3,4)</sup>. Sin embargo, existen algunas dificultades conocidas para obtener proteínas cristalizadas en cantidades suficientemente grandes y que den una buena calidad para los posibles ensayos de difracción de rayos X<sup>(9)</sup>. En consecuencia no se cuenta en la actualidad con la estructura tridimensional de la mayoría de proteínas<sup>(10)</sup>, lo que brinda espacio y oportunidad, para hacer uso de diferentes métodos dentro de las ciencias biomédicas para el conocimiento de las estructuras de proteínas de interés biológico y en especial buscando las posibilidades de aplicaciones dentro de la odontología moderna en que se usa estructuras de proteínas como base de estudio<sup>(11)</sup>.

En los últimos años se ha dado un notable avance en los métodos de cálculo de la química computacional orientados al modelaje y evaluación de las proteínas. A partir de ellos, se pueden analizar *in silico* sus interacciones, de tal manera que se convierten en una alternativa viable para ahorrar tiempo en el diseño de experimentos con mejores expectativas de éxito y disminuir costos en materiales y reactivos<sup>(12)</sup>. Actualmente, mediante estos métodos computacionales se pueden generar y disponer de algunos modelos y esquemas que pueden permitir el descubrimiento de potenciales dianas terapéuticas para tratar determinadas patologías con nuevas opciones de tratamiento clínico<sup>(13)</sup>. Ejemplos de este enfoque son los tratamientos de las enfermedades periodontales relacionadas con la formación de biopelículas en las cuales se ven involucradas las proteínas generadoras de señales de comunicación interbacteriana mediada por el fenómeno del quórum sensing<sup>(14-16)</sup>.

Dentro de los métodos computacionales, el modelado comparativo de proteínas es uno de los más empleados para la obtención de modelos tridimensionales, se fundamenta en la construcción de modelos de la proteína problema a partir de proteínas moldes con funciones relacionadas y estructuras 3D determinadas experimentalmente<sup>(17-19)</sup>. Este método considera que las proteínas comparten el armazón principal de su estructura y la función de esos productos génicos son determinados fundamentalmente por las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos que las componen. De tal manera que un modelado preciso de los residuos de la columna vertebral de la proteína, puede generar una información crucial en la evaluación del cálculo de las estructuras de las proteínas a modelar<sup>(20,21)</sup>.

La aplicación en la periodoncia moderna de los conceptos proteómicos en las bacterias abarca muchos campos de investigación dinámica y actual. Uno de esos enfoques es el estudio de los mecanismos de secreción de señales químicas llamadas autoinductores (AI). Estas moléculas se presentan a bajas concentraciones en una baja densidad bacteriana<sup>(22,23)</sup>, pero cuando la densidad bacteriana aumenta, la concentración de AI también se incrementa hasta un punto crítico para lograr la inducción de genes responsables de comportamientos diversos y patógenos de la comunidad bacteriana<sup>(24)</sup>. Cada bacteria produce un nivel de AI y al llegar a un umbral de concentración alto, el AI se une a receptores transcripcionales que controlan la expresión génica, iniciando una serie de procesos de fosforilación y defosforilación, que terminan en la represión o en la expresión génica de más AI que conducen a los fenómenos de mayor agresividad bacteriana, tales como la formación de biopelículas<sup>(13,25)</sup>.

Para la síntesis del autoinductor 2 (AI-2), en las bacterias (Figura 1) la enzima S-Ribosil homocisteinasa o mejor conocida como LuxS es clave en la ruta biosintética<sup>(26)</sup>, la cual actúa entre diferentes especies para la detección de quórum entre ellas, ya sean las bacterias Gram positivas o las Gram negativas<sup>(12)</sup>. La S-adenosil homocisteina (SAH), se forma como un subproducto de muchas reacciones dependientes de la metiltransferasa que actúan sobre la S-adenosil metionina (SAM)<sup>(27)</sup>, posteriormente la SAH es hidrolizada por la nucleosidasa llamada Pfs, liberando adenina y la S-Ribosil homocisteina (SRH). A continuación la LuxS rompe el enlace tioéter para producir L-homocisteína (Hcys) y 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD)<sup>(28,29)</sup>. La molécula de DPD se ciclizaba de forma espontánea para formar una furanona como la forma activa de la molécula de AI-2 en *Salmonella typhimurium*<sup>(30)</sup>. En diferentes bacterias, tales como la *P. gingivalis* y en *Vibrio harveyi*, la furanona señal se hace aún más compleja en su estructura incluyendo un átomo de Boro, para producir un furanosil borato diéster como AI-2 activo en otras especies bacterianas<sup>(14)</sup>.



**Figura 1.** Vía de la síntesis del autoinductor 2 y el sustrato de acción de la proteína LuxS (Tomado de Bioorg Med Chem. 2009 Sep 15; 17(18): 6699-6706. Epub 2009 Jul 26. Inhibition of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) by substrate analogues modified at the ribosyl C-3 position. Wnuk SF, Robert J, Sobczak AJ, Meyers BP, Malladi VL, Zhu J, Gopishetty B, Pei D.).

La *Porphyromonas gingivalis* es una bacteria Gram negativa anaerobia obligada, frecuentemente hallada en la placa subgingival de pacientes con periodontitis agresiva; el patógeno está implicado en la etiología de esta enfermedad inflamatoria, la cual conduce a la pérdida de tejidos de soporte del diente y la resorción de hueso periodontal, también está involucrada como factor de riesgo en otras condiciones dentro de las que destacan las enfermedades cardiovasculares y el bajo peso de neonatos prematuros<sup>(31)</sup>. *P. gingivalis* es una especie con alta diversidad genética, y esta variabilidad se cree que contribuye a su éxito en la colonización y la supervivencia en diversos huéspedes humanos, así como también en la evasión de las defensas del huésped y las estrategias de vacunación<sup>(32)</sup>. A pesar que la *P. gingivalis* es una bacteria oral de baja abundancia, se demuestra que su presencia, incluso a muy bajos niveles de colonización, provoca cambios en la cantidad y composición de la microbiota oral<sup>(33)</sup>.

El quórum sensing dependiente de LuxS en *P. gingivalis* indica que el sistema de señalización LuxS opera principalmente en las primeras etapas de crecimiento y coordina las actividades y diversos mecanismos de captación de hierro y hemina<sup>(34)</sup>, pero no es esencial en la expresión de la virulencia<sup>(34)</sup>. La virulencia de *P. gingivalis* está asociada con la elaboración de las cisteín-proteasas Arg-gingipainas y Lys-gingipainas, las cuales son producidas a altos niveles de densidad bacteriana<sup>(35)</sup>. Sin embargo, la atenuación del quórum sensing mediado por LuxS en *P. gingivalis* puede disminuir de forma significativa la formación de biopelículas con especies más agresivas como el *Streptococcus gordonii*<sup>(36)</sup>.

La identificación y tratamiento de patógenos de baja abundancia y alto impacto dentro de su entorno, como *P. gingivalis*, es un objetivo de interés para el tratamiento de enfermedades de etiología polimicrobiana. El quórum sensing mediado por LuxS es un mecanismo de comunicación que *P. gingivalis* comparte con gran parte de la microbiota que le rodea en la cavidad oral, sumándole el hecho de que es la enzima responsable de la síntesis del AI2 convierten a la proteína en una diana importante en lo que respecta al diseño de moléculas que puedan ser empleadas como tratamiento terapéutico alternativo al ya convencionalmente usado.

En la actualidad no se ha reportado un modelo experimental de la proteína LuxS de *P. gingivalis*, sin embargo aprovechando la similitud estructural y funcional con otras proteínas LuxS de otras bacterias, y aplicando modelado comparativo se pueden obtener modelos que permitan la posibilidad de efectuar y desarrollar estudios más amplios sobre inhibidores del mecanismo del quórum sensing, que

potencialmente puedan permitir dar una aproximación a la prevención y tratamiento de las enfermedades periodontales, desde una óptica diferente a los tradicionales métodos mecánicos. El modelamiento comparativo y el acoplamiento molecular pueden ofrecer una fuente de información útil, encaminada a esclarecer las propiedades estructurales y funcionales con relación a la inhibición de la LuxS en bacterias de la cavidad oral.

El objetivo de la presente investigación consistió en la obtención de un modelo homodimérico tridimensional de la proteína LuxS de *P. gingivalis* cepa W83, mediante modelado comparativo y el estudio de las interacciones más preponderantes que presenta con su sustrato natural, la ribosil homocisteína (RHC). Las poses que adopta RHC en el sitio activo de la proteína y las interacciones generadas entre las dos estructuras son analizadas a partir de resultados obtenidos de procesos de acoplamiento molecular (Docking); este último paso se realiza para evaluar si las poses con mejor valoración se acomodan en la cavidad de forma similar a los complejos RCH-LuxS obtenidos de forma experimental para otros microorganismos, de esta manera se muestra la importancia biológica del modelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el modelado comparativo de la proteína LuxS de *P. gingivalis* cepa W83 se establecieron 6 etapas secuenciales, de acuerdo con los criterios generales establecidos para este tipo de estudios, dentro de los cuales se mencionan<sup>(37,38)</sup>: **(I)** Selección del molde, **(II)** Alineamiento, **(III)** Construcción de un modelo para la cadena de átomos principales, **(IV)** Adición y optimización de cadenas laterales, **(V)** Refinamiento y optimización del modelo y **(VI)** Evaluación de la calidad del modelo.

**(I).** En la primera etapa se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína LuxS de *P. gingivalis* cepa W83 anotada en la base de datos <http://www.uniprot.org>. Después se estableció el número de proteínas homólogas LuxS registradas en Protein Data Bank (PDB) con estructuras tridimensionales resueltas. Este último paso se hizo para determinar que molde utilizar para la consecución del modelo monomérico de LuxS para *P. gingivalis*.

**(II).** Luego, la secuencia de cada una de las proteínas se alineó empleando el algoritmo psi-blast del servidor BLAST, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)<sup>(31,32)</sup>. El objetivo con un alineamiento óptimo es reducir al mínimo los *vacíos* y los *desfases* y maximizar las *coincidencias* entre las secuencias que se comparan. En este trabajo se comparó la secuencia suministrada de *P. gingivalis* con las secuencias de las estructuras depositadas en PDB para identificar regiones con similitud local. Un elemento clave en la evaluación de la calidad de un alineamiento de un par de secuencias es la matriz de sustitución, la cual asigna una puntuación al alineamiento de cualquier par de residuos posibles. Las teorías asociadas a las matrices de sustitución de aminoácidos se hallan bien documentadas y comparadas en la literatura<sup>(39-43)</sup>. En general, las diferentes matrices de sustitución están diseñadas para detectar similitudes entre las secuencias que divergen en cierto grado, no obstante una sola matriz puede ser razonablemente eficaz en un intervalo relativamente amplio de cambio evolutivo. Otro parámetro de gran utilidad es el valor de expectación el cual da una indicación de la significancia estadística de un par de secuencias alineadas y refleja el tamaño de la base de datos y el sistema de puntuación empleados; adicionalmente un alineamiento de secuencias con un valor de expectación de 10<sup>-6</sup> significa que la similitud entre las secuencias tendrá esa probabilidad de que sea por casualidad. Los parámetros de alineamiento utilizados se muestran en la Tabla 1.

**(III).** Un modelo estocástico del marco estructural de la proteína, correspondiente a la cadena de átomos principales, se construyó con ayuda del software MOE (Molecular Operating Environment). MOE crea varios modelos ponderados por el factor de Boltzmann, los cuales son generados seleccionando conformaciones de bucles a partir de un conjunto de fragmentos predeterminado de proteínas, los bucles son contruidos en las zonas donde no hay semejanza en las secuencias. Las condiciones utilizadas para la construcción del modelo se detallan en la Tabla 2.

**(IV).** Seguidamente, la adición de las cadenas laterales de los modelos intermedios se realizó seleccionando rotámeros de estas almacenados en una base de datos interna del programa MOE. La temperatura de simulación fue 300° K.

**(V).** El refinamiento de los modelos intermedios se realizó con una optimización estérica, electrostática y minimización energética con un RMS<sup>(33)</sup> del gradiente para el modelo final de 0.5 kcal. Bajo estas condiciones se construyó un modelo de cada cadena monomérica de la proteína LuxS de *P. gingivalis* cepa W83.

**(VI).** Finalmente, la calidad del modelo obtenido para la proteína LuxS se evaluó midiendo el grado de coincidencia con las estructuras 3D de LuxS reportadas para otras bacterias, diagramas de Ramachandran, los servidores Verify3D, Errat y ProSA-web.

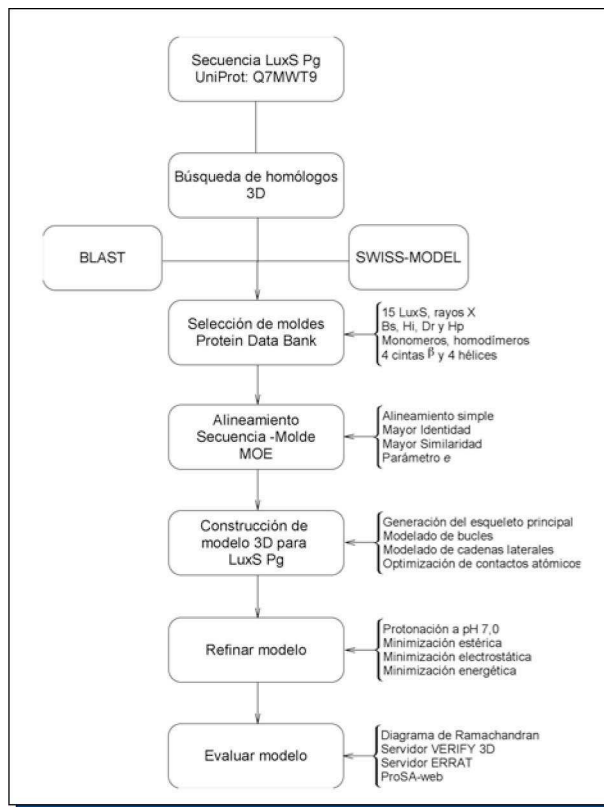
Un esquema de estas etapas se muestra en el Gráfico 1.

**Tabla 1.** Principales parámetros introducidos en BLAST. Los demás parámetros se mantuvieron predeterminados.

Código o secuencia	Q7MWT9
Base de datos	Protein Data Bank
Algoritmo	PSI-BLAST
Matriz de valoración	BLOSUM (62, 45) y PAM (30, 70)
Número máximo de moldes a considerar	50
Umbral de expectación	1.0 x 10 <sup>-6</sup>
Longitud de la serie de residuos a comparar	3

**Tabla 2.** Parámetros empleados para la construcción de un modelo por homología de LuxS *P. gingivalis*. Se simuló agua como solvente externo dado que LuxS es una proteína citosólica.

Molde	1J6X
Modelos de la cadena principal	10
Modelos de las cadenas laterales	3
Refinamiento del modelo	Estérico y electrostático
Campo de fuerzas	MMFF94x
Constante dieléctrica externa	80



**Gráfico 1.** Diagramación del proyecto de diseño y desarrollo del proyecto de forma gráfica.

Después de finalizada la construcción y posterior evaluación del modelo de la proteína problema, se realizó un acoplamiento de

la proteína 1JVI<sup>(44)</sup> con su ligando natural, la ribosil homocisteína, para determinar la capacidad del software de replicar las condiciones biológicas de la proteína y la pose que adopta el ligando en el sitio de unión, ulterior a este procedimiento se acopló el homodimero de LuxS con la ribosil homocisteína para establecer la importancia biológica que tiene el modelo.

El acoplamiento ligando-receptor se realizó con el módulo Surfex<sup>(45)</sup> de SYBYL, que emplea un algoritmo flexible y automático para realizar el acoplamiento molecular; combina la función de calificación Hammerhead<sup>(14)</sup> con un motor de búsqueda que se basa en un método de similitud en la superficie molecular como un medio para generar acoplamientos rápidos de diferentes fragmentos moleculares, se resalta que los resultados obtenidos en tiempo, implican una optimización de los parámetros del software para obtener modelos confiables, reproducibles y precisos.

Surflex usa una función empírica (Total Score) basada en la afinidad de unión ligando-proteína de complejos experimentales. Es una función ponderada de funciones linealmente independientes relacionadas con las distancias en la superficie de van der Waals entre átomos interactuantes (expuestos) del receptor y el ligando; la lista de estos átomos de interés es establecida seleccionando los pares atómicos del complejo para los cuales la distancia en la superficie de van der Waals es mayor de 2Å, el resto de pares atómicos remanentes son etiquetados como polares o no polares dependiendo su naturaleza, adicionalmente a cada átomo polar se le asigna una carga.

La función de valoración incluye los siguientes términos:

- **Hidrofóbicos.** Calculados como una suma ponderada de funciones sobre todos los pares de átomos, en los cuales al menos un átomo es no polar. Las funciones evalúan contactos atómicos e interpenetración atómica.
- **Polares.** Computados como una función formada por la suma de todos los pares de átomos polares complementarios, la función considera enlaces de hidrógeno y puentes salinos; posee un término que favorece la geometría experimental observada de los enlaces de hidrógeno y un término que favorece las interacciones entre átomos formalmente cargados.
- **Repulsivos.** Calculados como una sumatoria de todos los pares de átomos interactuantes que poseen la misma polaridad; esta función evalúa contactos polares desfavorables.
- **Entrópicos.** Evaluados con una función que cuantifica la pérdida de entropía trasnacional y rotacional del ligando cuando se ubica en el sitio de unión del receptor, la función toma en cuenta el peso molecular y el número de enlaces rotables del ligando.
- **Solvatación.** Estos términos son cuantificados con una función que evalúa la diferencia entre los enlaces de hidrógeno encontrados y los posibles enlaces de hidrógeno equivalentes que se podrían formar.
- **Contactos Próximos.** La función *Crash* evalúa el grado de penetración inadecuada del ligando en el sitio de unión del receptor como también los contactos muy próximos del mismo ligando.

Los pasos que se emplearon para la realización del acoplamiento fueron la adecuación del receptor y la preparación del ligando. En el Gráfico 2 se muestra el esquema de la metodología que se llevó a cabo para el acoplamiento entre LuxS y la ribosil homocisteína.

La adecuación del receptor se enfoca en la elección de la cavidad donde se produce la interacción con el ligando, esta designación se logra con la formación del protomol<sup>(46)</sup>, el cual es un sitio idealizado de enlace con el ligando que se ubica en la estructura de la proteína. La generación del protomol conlleva dos series de pasos consecutivos:

- **Generación del Input** en la estructura de la proteína que incluya la presencia de hidrógenos, la lista de los residuos que permita la identificación del sitio activo de la proteína. La presencia de un ligando dentro del sitio de unión de la proteína se utiliza solamente como referente para identificar los residuos constitutivos del sitio de unión.
- **Generación del Output,** con la generación del protomol, que sirve como blanco para los ligandos a evaluar, se desarrolla una serie de procedimientos de ubicación de diferentes fragmentos moleculares del ligando dentro del sitio de enlace de la proteína en diversidad de posiciones y que son optimizados para la interacción con la proteína.

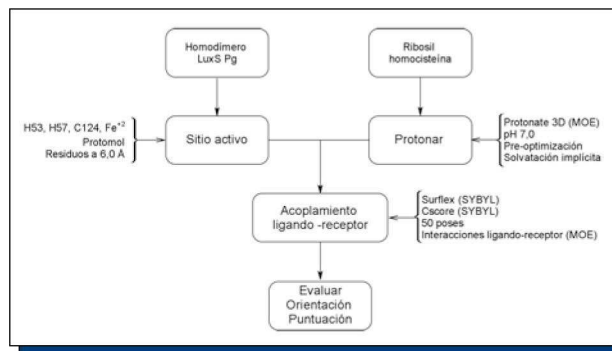


Gráfico 2. Metodología general para el acoplamiento LuxS-ribosil homocisteína.

## RESULTADOS

En el presente estudio *in silico* se aplicaron herramientas computacionales que permitieron obtener una descripción atómica adecuada de una cadena polipeptídica, basándose en proteínas molde relacionadas, con estructuras resueltas experimentalmente, lo que condujo a la predicción funcional, y a desarrollar un modelo para la proteína LuxS en la *P. gingivalis* cepa W83 de forma adecuada.

La estructura primaria de la proteína LuxS de *P. gingivalis* modelada está compuesta de 159 residuos (Tabla 3) cuya estructura 3D no ha sido reportada hasta la fecha. Sobresalen los residuos H53, H57 y C124, los cuales se cree se unen a unión Fe2+ reportado en las ribosil homocisteinas<sup>(26)</sup>.

Tabla 3. Estructura primaria de LuxS *P. gingivalis*.

LuxS Pg	Secuencia
159 aa	MEKIPSFQLDHIRLKRGIYVSRKDYIGGEVVTTFDIRMKEPNREPVLG APELHTIEHLAATYLRNHPYKDRIVFWGPMGLCTGNYFLMRGDYV SKDILPLMQETFRFIRDFEGEVPGETPRDGNCLLHNLMPAKYAEAK YLREVLVATEENLNYPD

Los resultados que se logran en el proceso de exploración en Protein Data Bank (PDB), www.pdb.org, muestran que hasta noviembre de 2011, existían 15 estructuras reportadas asociadas a 4 especies de bacterias diferentes, todas resueltas por difracción de rayos X. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Resultados obtenidos de los alineamientos realizados con la BLAST se muestran en la Tabla 5, los alineamientos reportados son realizados con el monómero A de cada molde.

Realizando una nueva búsqueda en BLAST cambiando la matriz de valoración a BLOSUM45 son obtenidos los mismos moldes aunque con un orden diferente en las estructuras 1VGX y 1YCL. En la matriz BLOSUM los valores están basados en la observación de frecuencias de sustitución en bloques de alineamientos locales de proteínas relacionadas, de esta manera se enfoca en las regiones conservadas, BLOSUM62 y BLOSUM45 se refieren a alineamientos con un máximo de 62% ó 45% de identidad entre las secuencias comparadas. Cabe resaltar que también se empleó la matriz de sustitución PAM, sin embargo, su resultado también fue la estructura con código 1J6X. Las matrices PAM son derivadas de alineamientos globales de secuencias relacionadas, a mayor número de la matriz PAM empleada mayor es la distancia evolutiva entre las secuencias comparadas.

Para corroborar los resultados obtenidos en BLAST se utilizó el servidor SWISS-MODEL, swissmodel.expasy.org, empleando la herramienta *Template Identification*, si bien este servidor permite generar un modelo por homología de forma automática solo se utilizó para identificar posibles moldes para construir el modelo.

Los resultados generados por BLAST y SWISS-MODEL permitieron seleccionar la estructura 1J6X<sup>(47)</sup> como molde para construir el modelo final de LuxS de *P. gingivalis*.

La construcción del modelo se realizó con MOE (Molecular Operating Environment), el cual genera un modelo estocástico; las condiciones para la construcción del modelo se detallan en la Tabla 2.

El modelo de la LuxS de la *P. gingivalis* cepa W83 arrojó que es muy similar a sus proteínas homólogas, es una enzima homodimérica con una incorporación de dos sitios idénticos de forma tetraédrica para

**Tabla 4.** Resultados obtenidos de PDB para la búsqueda de LuxS. Bs=*Bacillus subtilis* (157 residuos), Dr=*Deinococcus radiodurans* (166 residuos), Hi=*Haemophilus influenzae* (167 residuos) y Hp=*Helicobacter pylori* (160 residuos).

Código PDB	Organismo	Resolución Å	N° residuos		
			Cadena A	Cadena B	Resueltos
2FQO	Bs	1.87	V4-G157	-	155
2FQT		1.79	V4-G157	-	155
1YCL		1.80	V4-G157	-	155
1JQW		2.30	E8-G157	-	150
1JVI		2.20	V4-G157	-	154
1IE0		1.60	P2-G157	-	156
1J98		1.20	V4-G157	-	156
1VJE	Dr	1.64	E8-L156	V7-L156	149-150
1VH2		2.00	V7-R158	-	152
1VGX		1.90	E8-L156	N6-L156	149-151
1INN		1.80	N6-L156	V7-L156	151-150
1J6V		2.10	V7-E157	-	151
1JOE *	Hi	2.40	V9-N156	-	148
1J6W		2.10	L3-N163	L3-N162	161-160
1J6X **	Hp	2.38	Mse1-G151	Mse1-V152	151-152

\* 1JOE es un tetrámero, todas las subunidades tienen la misma composición y longitud.  
 \*\* El residuo Mse es seleniometionina.

**Tabla 5.** Resumen de los resultados obtenidos con BLAST.

Código PDB	Valor E	Puntaje	Residuos			
			Idénticos (%)	Similares (%)	Vacios	Residuos
1J6X	2 x 10-21	84.7	49%	28%	9	143
2FQO	3 x 10-17	73.6	48%	26%	10	142
1VH2	4 x 10-17	73.9	45%	32%	14	155
1J98	6 x 10-16	70.5	47%	26%	10	142
1IE0	2 x 10-15	69.3	47%	26%	10	142
1VGX	2 x 10-15	69.7	44%	32%	14	155
1YCL	2 x 10-15	68.9	46%	26%	10	140
1INN	1 x 10-14	67.4	43%	30%	14	152
1JOE	2 x 10-12	61.6	50%	31%	12	164
1J6W	2 x 10-9	53.5	46%	31%	12	159

**Tabla 6.** Resumen de los resultados obtenidos con SWISS-MODEL.

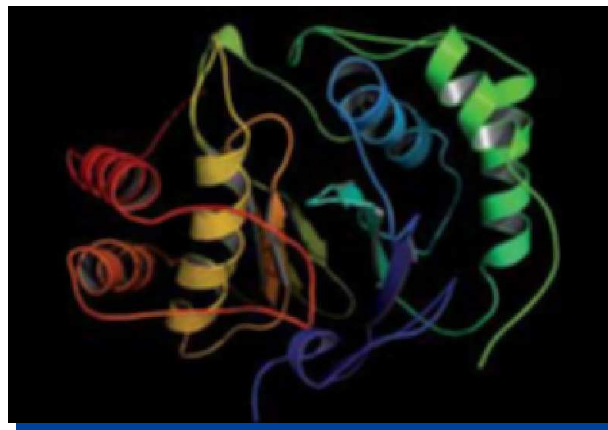
Código PDB	Valor E	Puntaje	Residuos			
			Idénticos %	Similares %	Huecos	Alineados
1J6X *	7 x 10-18	86.3	50%	29%	9	143
2FQT	5 x 10-13	70.1	39%	22%	4	109
1INN	1 x 10-12	68.6	45%	32%	18	151
1VH2	2 x 10-12	68.6	45%	32%	18	151
1YCL	7 x 10-12	66.6	38%	22%	4	109
1J98	9 x 10-11	62.8	38%	22%	4	109
1IE0	2 x 10-10	61.6	38%	22%	5	109
1VGX *	5 x 10-10	60.5	44%	32%	14	151
1J6W	9 x 10-10	59.3	49%	31%	12	161

\* Se seleccionó la cadena B de cada estructura para el análisis.

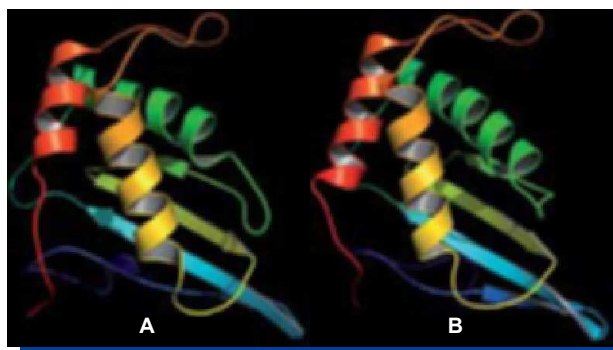
sitios de unión a metales. Estos centros metálicos están compuestos cada uno por un átomo de Fe<sup>2+</sup> en su forma natural y con algunos residuos altamente conservados en el sitio activo, formado por dos histidinas, una cisteína, y probablemente, una molécula de agua, la conformación y estructura del sitio activo concuerda a los sitios activos que se encuentran en LuxS de otras bacterias.

El modelo se presenta en las Figuras 2 y 3.

La determinación de la estructura de cada una de las cadenas A y B, revela la existencia de cuatro hojas beta antiparalelas, tres hélices alfa y una hélice 3<sub>10</sub>, de forma similar a las diferentes estructuras de las diversas proteínas LuxS conocidas (Figura 3A y B).



**Figura 2.** Imagen del modelo homodimérico propuesto para la proteína LuxS de la *P. gingivalis* cepa W83, obtenida en Pymol.



**Figura 3A y B.** Modelo propuesto para las cadenas monoméricas A y B de la proteína LuxS de la *P. gingivalis* cepa W83 con la estructura terciaria.

La evaluación de la calidad de un modelo es un aspecto clave desde que se desarrollaron los primeros métodos de predicción de estructura de proteínas, siendo importante resaltar que el modelo que se propone en el presente artículo, se evaluó positivamente con el empleo de diversos métodos de validación de uso internacional.

Una estrategia de validación de los modelos obtenidos por homología, es la utilización de los diagramas de Ramachandran<sup>(48)</sup>, ya que en ellos se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diedros  $\Psi$  (psi) contra  $\Phi$  (phi) en los aminoácidos de un polipéptido, que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas. La utilización de esta herramienta permite, por lo tanto, aproximar de manera temprana y confiable cual será la estructura secundaria del péptido, ya que existen combinaciones de ángulos típicas para cada estructura, tales como las  $\alpha$ -hélice y las hojas  $\beta$  (Figura 4). De acuerdo a los resultados obtenidos en el servidor Rampage<sup>(49)</sup>, la ubicación de los ángulos y de las torsiones de los enlaces de los aminoácidos que forman la estructura secundaria evaluada se encuentran dentro de niveles aceptados y permitidos, obteniéndose una validación suficiente para el modelo propuesto.

**Resumen del Diagrama de Ramachandran**

Zona	Monómero A	Monómero B	Homodímero
Favorecida	132 (88.6%)	139 (91.4%)	267 (88.7%)
Permitida	17 (11.4%)	12 (7.9%)	33 (11.0%)
Atípica	0 (0.0%)	1 (0.7%)	1 (0.3%)

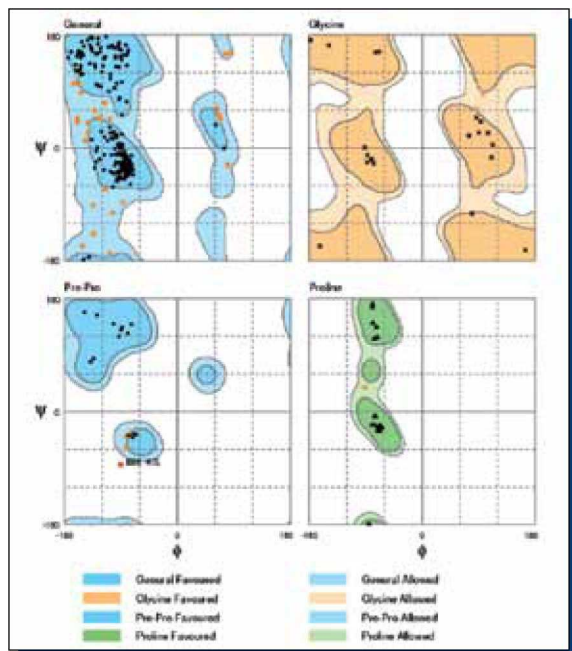


Figura 4. Diagrama de Ramachandran del homodímero del modelo de la proteína LuxS de la *P. gingivalis* cepa W83. El diagrama se obtuvo con Rampage (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Otra estrategia de evaluación usada fue la valoración por Verify3D<sup>(50)</sup> y Errat<sup>(51)</sup> los resultados se muestra en la Tabla 7, de acuerdo con los valores umbrales permitidos, los modelos presentan valores no concordantes, principalmente el modelo de la cadena B.

El servidor Verify3D analizó la compatibilidad tridimensional del modelo atómico, contra su propia secuencia de aminoácidos. A cada residuo se le asignó una clase estructural en función de su ubicación y el entorno, arrojando un número en porcentaje que se considera validado por encima de 60%. A pesar del resultado obtenido por el modelo propuesto, es indispensable resaltar que es satisfactorio por el porcentaje de similitud inicial del molde utilizado.

Con relación al Errat se establece que es un algoritmo de verificación que permite evaluar la estructura de la proteína problema<sup>(51)</sup>, que es adecuado para evaluar el progreso de la construcción de modelos y su refinamiento. El programa trabaja mediante el análisis de las estadísticas de las interacciones entre los diferentes tipos de átomos. Los resultados obtenidos muestran unos límites de confianza del modelo propuesto, que tienen mayor valor en la cadena A y menos valor en la cadena B, similar a lo expresado en la interpretación con Verify3D, el resultado es considerado aceptable en la cadena A para el modelo propuesto, pero se observan debilidades en la evaluación de la cadena B.

Tabla 7. Evaluación obtenida para los monómeros A, B y el homodímero, obtenidos por modelado comparativo de LuxS *P. gingivalis*.

Estructura	Verify3D	Errat
Modelo de la cadena A	59.74%	53.659
Modelo de la cadena B	52.90%	19.403
Modelo del homodímero	59.74%	33.607

La evaluación que se logra por la utilización del servidor ProSA-web, muestra que la puntuación obtenida de las cadenas monoméricas A y B, se ubican dentro de un rango de posiciones permitidas y validadas. ProSA-web ofrece una interfaz basada en el programa PROSA<sup>(52)</sup>, empleado con frecuencia en la validación de estructura de proteínas. El programa cuantifica la calidad global de la estructura en evaluación, si el resultado se encuentra fuera de un rango característico de proteínas nativas de similar tamaño la estructura probablemente contiene errores. El modelo de LuxS de *P. gingivalis* obtuvo una valoración global de y -4.59 y -4.19 para los monómeros A y B respectivamente, estos valores les ubican en una zona de aceptación, no obstante, comparados con LuxS elucidadas por espectroscopía de rayos X (Tabla 8) los modelos monoméricos muestran un mayor valor. ProSA-web también evalúa la calidad local de la estructura señalando las posibles partes problemáticas

del modelo, estas regiones tienden a estar asociadas con zonas de alta energía. Cuando el programa evalúa la calidad local lo hace por bloques de residuos. Teniendo en cuenta la longitud de la secuencia, el análisis del perfil energético empleando bloques de 10 residuos fue el más adecuado comparándolo con otros perfiles obtenidos utilizando un mayor número de residuos por bloque, ya que discrimina mejor las regiones problemáticas de los modelos. Los perfiles energéticos de los monómeros (Figura 5C y D) muestra 5 zonas donde la energía es positiva, estas zonas corresponden a residuos que conforman principalmente bucles. En la Figura 5 se muestran los diagramas que arroja la evaluación de ProSA-web (5A y B para la evaluación global, y C y D para la evaluación local).

Tabla 8. Resultados de la evaluación global realizada con ProSAweb en las cadenas monoméricas de todas las LuxS reportadas en Protein Data Bank y los modelos monoméricos para *P. gingivalis*.

Estructura	z-score	Estructura	z-score	Estructura	z-score
1VGX_a	-6.31	1J6W_a	-6.44	1IE0	-6.65
1VGX_b	-6.38	1J6W_b	-6.36	1J98	-6.93
1INN_a	-6.15	1J6X_a	-6.37	1VJE_a	-6.14
1INN_b	-6.13	1J6X_b	-6.23	1VJE_b	-6.09
1J6V	-6.07	2FQO	-6.79	1VH2	-6.04
1JOE_a	-6.32	2FQT	-6.64	Cadena A	-4.59
1JOE_b	-6.62	1YCL	-6.75	Cadena B	-4.19
1JOE_c	-6.79	1JQW	-6.82		
1JOE_d	-6.75	1JVI	-6.91		

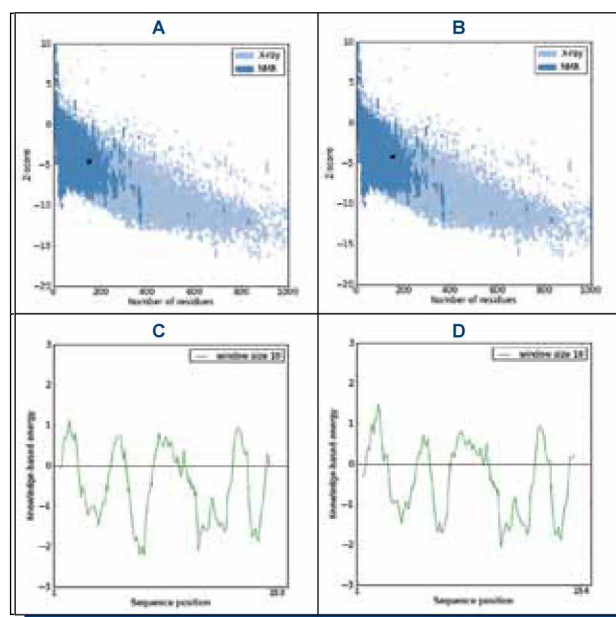


Figura 5A, B, C y D. Resultados gráficos obtenidos con ProSA-web de las cadenas monoméricas A y B de la proteína LuxS de *P. gingivalis* cepa W83.

Considerando los resultados obtenidos de los diferentes servidores se puede concluir que, a pesar del proceso de refinamiento, los modelos presentan zonas de gran tensión, sin embargo el sitio de unión ligando- proteína está excluido de esas zonas.

Un aspecto de interés también evaluado en los modelos fue el grado de coincidencia con una estructura 3D de LuxS reportada; para lo cual se realizó un alineamiento estructural tomando como estructura de comparación el monómero A del homodímero 1J6X (Tabla 9) con el módulo Biopolymer de Sybyl 7.0.

El RMSD<sup>(53)</sup> (Root-Mean-Square Deviation) es una medida de la distancia promedio entre un par de átomos equivalentes en las proteínas superpuestas, es empleada como una medida de la divergencia de las dos estructuras; la puntuación de identidad (% identidad) se calcula como el número de residuos idénticos en las dos secuencias dividido por la longitud de la secuencia más corta sin espacios. Estos parámetros, en general, muestran que estructuras con mayor similitud al molde pueden ser más divergentes que los modelos obtenidos, tal como se puede observar en la Tabla 9.

La estructura del ligando, la ribosil homocisteína, se obtuvo de la proteína 1JVI, en la Figura 6B se muestra la pose que adopta el ligando en un mapa de flexibilidad del receptor, la parte inferior de la escala

muestra las zonas más rígidas y la parte superior las más flexibles; como se puede notar el ligando se ubica en una cavidad con poca movilidad dentro del receptor y orienta el anillo de ribosa hacia el átomo metálico. El mapa de flexibilidad molecular es obtenido a partir del factor de temperatura de las estructuras cristalinas empleando el módulo Molcad de Sybyl 7.0. Para establecer la influencia del ligando en la rigidez del receptor también se determinó el perfil de flexibilidad de las demás LuxS obtenidas por cristalografía de rayos X. Los resultados señalan que la cavidad donde se aloja la ribosil homocisteína es poco móvil. En la Figura 6A se muestra el perfil de flexibilidad de la estructura 1J98 como ejemplo ilustrativo.

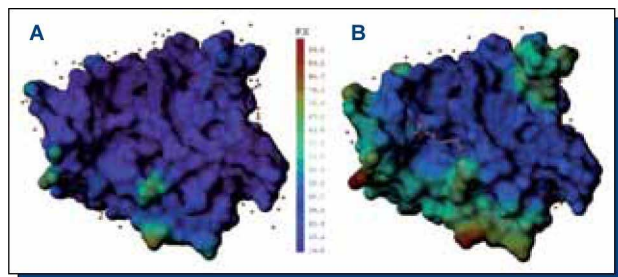


Figura 6A y B. Mapa de flexibilidad de las proteínas 1JVI (A) y 1J98 (B) y ubicación del ligando natural.

### ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Para evaluar la utilidad del modelo obtenido se efectuó un acoplamiento molecular entre la ribosil homocisteína y el modelo homodimérico de LuxS de *P. gingivalis* cepa W83 con el módulo Surflex<sup>(45)</sup> y complementado con el módulo Cscore<sup>(54)</sup>, ambos de Sybyl 7.0. Previa al acoplamiento entre LuxS de *P. gingivalis* y la ribosil homocisteína se acopló esta última con el receptor del complejo 1VJI, puesto que ribosil homocisteína es el ligando nativo de este complejo, el acoplamiento se realizó para medir la capacidad de Surflex para recrear la pose experimental del ligando. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y en la Figura 7.

Tabla 9. Alineamiento de estructuras con Biopolymer.

Microorganismo	Código	RMSD (Å)	% identidad
Modelo	Cadena_A	1.583	34.0%
	Cadena_B	2.040	34.0%
<i>Bacillus subtilis</i>	2FQO	1.800	49.0%
	2FOT	1.794	49.0%
	1YCL	1.820	48.3%
	1JQW	1.814	47.6%
	1JVI	1.788	49.0%
	1IE0	2.077	48.3%
	1J98	1.778	49.0%
<i>Deinococcus radiodurans</i>	1VJE_a	1.633	43.2%
	1VJE_b	1.628	43.5%
	1VH2	3.323	44.2%
	1VGX_a	1.889	43.2%
	1VGX_b	2.137	43.9%
	1INN_a	1.631	43.9%
	1INN_b	2.045	43.5%
1J6V	3.342	44.2%	
<i>Haemophilus influenzae</i>	1JOE_a	1.831	38.3%
	1JOE_b	1.791	38.3%
	1JOE_c	1.860	38.3%
	1JOE_d	1.798	38.3%
	1J6W_a	4.539	39.2%
	1J6W_b	3.717	38.5%
<i>Helicobacter pylori</i>	1J6X_b	0.386	100.0%

Tabla 10. Valoración generada por Surflex para cada pose de la Ribosil homocisteína en el sitio activo del receptor del complejo 1VJI.

Poses	Total Score	Similaridad	Cscore	Poses	Total Score	Similaridad	Cscore
pose-0	6.630	0.727	4	pose-25	5.371	0.722	3
pose-1	6.541	0.719	4	pose-26	5.359	0.729	4
pose-2	6.480	0.744	4	<b>pose-27</b>	<b>5.052</b>	<b>0.558</b>	<b>2</b>
pose-3	6.405	0.738	4	pose-28	5.018	0.724	2
pose-4	6.245	0.737	4	pose-29	4.954	0.743	2
pose-5	6.088	0.768	3	pose-30	4.863	0.724	2
<b>pose-6</b>	<b>5.818</b>	<b>0.646</b>	<b>3</b>	pose-31	4.848	0.789	2
pose-7	5.767	0.739	4	<b>pose-32</b>	<b>4.712</b>	<b>0.538</b>	<b>2</b>
pose-8	5.759	0.771	3	pose-33	4.662	0.749	4
pose-9	5.652	0.771	3	pose-34	4.654	0.599	1
pose-10	5.596	0.727	4	pose-35	4.611	0.719	4
pose-11	5.572	0.773	3	<b>pose-36</b>	<b>4.580</b>	<b>0.631</b>	<b>2</b>
pose-12	5.568	0.776	3	pose-37	4.451	0.739	1
pose-13	5.563	0.725	4	pose-38	4.443	0.739	1
pose-14	5.537	0.721	4	pose-39	4.394	0.688	1
pose-15	5.519	0.769	3	pose-40	4.354	0.743	1
pose-16	5.505	0.777	3	pose-41	4.310	0.766	1
pose-17	5.501	0.722	4	<b>pose-42</b>	<b>4.273</b>	<b>0.161</b>	<b>1</b>
pose-18	5.497	0.778	3	pose-43	4.272	0.712	3
pose-19	5.490	0.734	3	pose-44	4.179	0.752	1
pose-20	5.483	0.743	2	<b>pose-45</b>	<b>3.790</b>	<b>0.705</b>	<b>1</b>
pose-21	5.472	0.723	3	pose-46	3.484	0.658	1
pose-22	5.455	0.747	3	<b>pose-47</b>	<b>3.473</b>	<b>0.519</b>	<b>2</b>
pose-23	5.417	0.734	3	<b>pose-48</b>	<b>3.393</b>	<b>0.535</b>	<b>1</b>
pose-24	5.394	0.717	3	<b>pose-49</b>	<b>2.492</b>	<b>0.594</b>	<b>1</b>

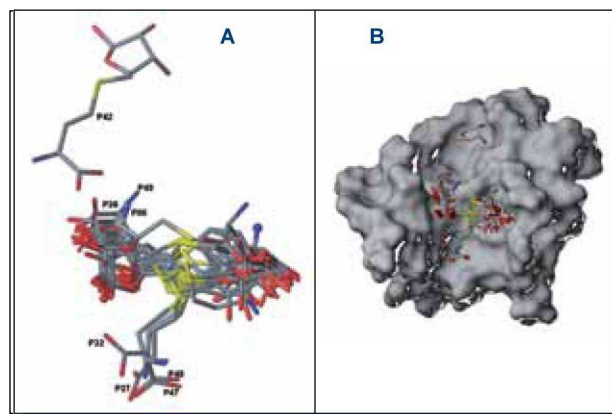


Figura 7A y B. Poses que adopta la molécula de Ribosil homocisteína, en la Figura 7A se compara con el ligando co-cristalizado y en la B se muestra como se ubican en el sitio activo.

La función de evaluación *Total Score* de Surflex expresa la afinidad de enlace en unidades de  $-\log_{10}$  (Kd); en tanto que la *similaridad*<sup>(55)</sup> es una medida de cuanto se parece la pose del ligando a la estructura de referencia, en este caso la ribosil homocisteína co-cristalizada, su valor oscila entre 0 y 1, siendo 1 el valor que describe una concordancia perfecta. La función de consenso *Cscore* se basa en las funciones evaluación *Chemscore*<sup>(56)</sup>, *Gscore*<sup>(57)</sup>, *PMF-score*<sup>(58)</sup> y *D-score*<sup>(59)</sup>, su utilidad estriba en su poder discriminante de poses muy parecidas; se cuantifica de 0 a 5, siendo 4 y 5 las mejores calificaciones cuando no se tiene una estructura de referencia.

Los resultados obtenidos de este acoplamiento muestran 9 poses que difieren significativamente de la estructura de referencia, 4 de esas poses se orientan de forma inversa a ella, en otras 4 la homocisteína de las poses se orienta hacia una zona de baja polaridad constituida por los residuos Phe 62, Pro 119 y Ala 120. En general, los resultados mostraron un 82% de concordancia en la orientación y 73.6% en la similaridad con la estructura de referencia, lo que ratifica la importancia del software en modelar una aproximación a una condición biológica.

Las condiciones básicas para el acoplamiento entre el modelo homodimérico de LuxS de *P. gingivalis* y la ribosil homocisteína se resumen en tres etapas: Identificación del sitio de unión en el receptor, preparación del ligando y optimización de los parámetros de acoplamiento.

El sitio de unión en el homodímero fue determinado como los residuos ubicados en un radio de 6.0 Å alrededor de la triada His 53, His 57 y Cys 124 y el ion Fe<sup>+2</sup>, estos residuos se muestran en la Tabla 11. El ligando fue protonado simulando un estado de pH 7.0 y los parámetros de búsqueda de Surflex empleados fueron de 50 conformaciones por fragmento y 50 poses totales para el ligando. Cada pose reportada

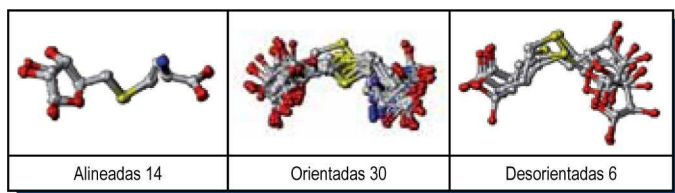
fue sometida a una optimización previa y una posterior al proceso de acoplado, adicionalmente se empleó el módulo Cscore, el cual incluye 4 funciones de valoración (Chemscore, Dscore, Gscore y PMFscore), como complemento a la función de valoración interna de Surfex, esto con el objetivo de minimizar las poses mal ubicadas.

El proceso de acoplamiento generó un conjunto de 50 poses del ligando, de las cuales 44 orientan el anillo de ribosa hacia el átomo metálico y su función evaluadora de consenso (Cscore) toma valores de 3 a 5, las 6 restantes lo hacen de forma contraria y su función Cscore oscila de 1 a 2. Cabe resaltar que de las poses bien orientadas 14 de ellas tienen buen alineamiento y un Cscore de 5 (Figura 8).

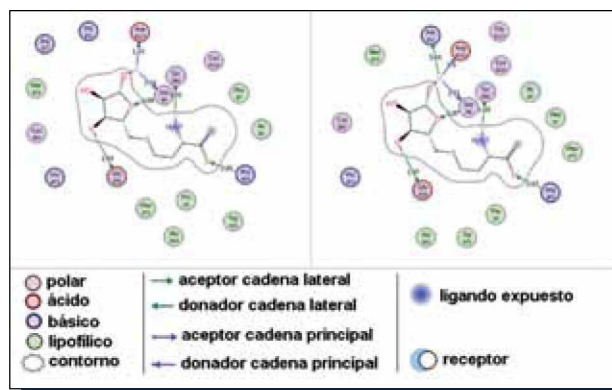
Los residuos del receptor que interactúan con la ribosil homocisteína son dependientes de la pose que esta adopte en el sitio de unión. Como se ilustra en la Figura 9, una leve variación en la conformación del ligando dentro del sitio de unión puede generar la aparición de interacciones importantes; las interacciones mostradas corresponden a poses tomadas del conjunto alineado. Este conjunto de estructuras interactúan principalmente con residuos polares, entre los que siempre se mantienen Glu 56, Arg 64 y Asp 123 en la cadena A y Ser 6 en la cadena B, y con menos frecuencia His 11 y Tyr 86 de la cadena B.

**Tabla 11.** Residuos constitutivos del sitio de unión.

Cadena	Residuos
A (16)	Leu 52, His 53, Thr 54, Ile 55, Glu 56, His 57, Trp 76, Gly 77, Pro 78, Gly 118, Glu 120, Arg 122, Asp 123, Cys 124, Gly 125, His 130
B (27)	Glu 2, Ile 4, Pro 5, Ser 6, Phe 7, Gln 8, Leu 9, Asp10, His 11, Ile12, Leu 14, Arg 16, Ile 36, Arg 37, Met 38, Lys 39, Pro 41, Asn 42, Gly 77, Pro 78, Met 79, Gly 80, Cys 81, Gly 84, Asn 85, Tyr 86, Phe 87
Cofactor (1)	Fe <sup>2+</sup>



**Figura 8.** Poses que adopta la Ribosil homocisteína en el sitio de unión de la LuxS.



**Figura 9.** Interacciones ligando-receptor para 2 de las poses de la Ribosil homocisteína.

## DISCUSIÓN

Los cálculos por homología ofrecen una poderosa base para los métodos que predicen las características estructurales de una nueva proteína sin estructura 3D resuelta, basándose en su similitud con estructuras 3D de proteínas conocidas y sus secuencias de proteínas<sup>(60)</sup>. La similitud en la secuencia completa o en un fragmento de gran tamaño, permite la predicción y modelización de todos los dominios estructurales, mientras que las estadísticas derivadas de las distribuciones de las características locales de estructuras de proteínas conocidas permite que sea posible predecir características de las proteínas con estructuras 3D desconocidas<sup>(17)</sup>.

El modelo obtenido en la *P. gingivalis* cepa W83 hasta donde

se tiene conocimiento, es el primer reporte que se hace sobre un modelo por homología de la proteína LuxS en una bacteria asociada a las enfermedades periodontales, lo que permite proponer el presente modelo como una herramienta importante para el estudio estructural y de funciones de la mencionada proteína, de tal manera que se desarrollen propuestas de investigaciones adicionales. La respuesta del trabajo actual no solo recae en la propuesta de un modelo para la proteína LuxS de la *P. gingivalis* cepa W83, sino en la validación del modelo por diversos métodos, para proponer un modelo confiable y realista, a pesar de iniciar con una plantilla molde con menos de 50% de similitud en la secuencia de amino ácidos, cuando la semejanza de la secuencia entre la plantilla molde y la secuencia del problema es inferior al 42%, se aumenta la probabilidad que el modelo resultante sea inapropiado<sup>(61)</sup>. Lo que permite establecer que el modelo obtenido es bueno, ya que a pesar de iniciar con una plantilla molde de una similaridad no muy alta, produciendo un resultado validado por diversas herramientas bioinformáticas, que permite simular una realidad biológica.

La precisión de los modelos de estructuras de proteínas es suficiente para muchos fines prácticos tales como el análisis de los efectos de mutación puntual, las reacciones enzimáticas, las interfaces de interacción de los complejos de proteínas, e identificación de sitios activos<sup>(62)</sup>. Lo que se puede ver representado en diversos campos de aplicación tales como el diseño de medicamentos mejorados y basados en su estructura, tal como se requiere para tratar en la actualidad la enfermedad periodontal<sup>(15,16)</sup>.

El proceso del modelado molecular continúa su evolución aplicando una gran variedad de métodos computacionales al problema de identificar las complejas relaciones existentes entre estructuras moleculares y actividades biológicas en términos de interacciones entre los átomos constituyentes<sup>(63)</sup>. Es por lo tanto importante resaltar que la utilización de estas relaciones de forma predictiva para diseñar compuestos con un perfil de actividad que tenga aplicabilidad en campos poco explorados como la odontología para que se pueden observar sus frutos en algunos momentos<sup>(64)</sup>. Esta capacidad se ve reflejada en la introducción tanto de novedosas técnicas y métodos, así como en el uso de equipos de cómputo con una alta potencia para aplicar estos tratamientos al análisis de modelos moleculares en alto detalle y resolución<sup>(65,66)</sup>.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo un modelo por homología de la proteína LuxS en *P. gingivalis* cepa W83, por medio del uso de software tales como Sybyl, MOE con una topología bastante similar a las proteínas de la familia LuxS en diversas bacterias.

La proteína LuxS en diversas bacterias se encuentra asociada con la generación del AI-2, conocido como señal de comunicación inter bacteriana, de diversas especies asociadas entre otras patologías, al inicio y progreso de la enfermedad periodontal. Esa señal que se emplea como un lenguaje bacteriano que facilita el fenómeno del quórum sensing, dando como resultado el desarrollo de eventos tales como la aparición, formación y maduración de biopelículas, con el incremento de la dificultad en poder ser tratada la enfermedad periodontal.

El modelo obtenido por homología de la proteína LuxS en *P. gingivalis* cepa W83 superó diversas estrategias de validación, lo que permite proponerlo como una novedad dentro del campo de investigación periodontal.

Con ese mismo modelo obtenido, al realizar los acoplamiento moleculares, se logró un reproducibilidad superior a 70% en relación a las posiciones del ligando con las estructuras de referencia utilizadas. Lo que permite establecer que su importancia biológica de acuerdo a los cálculos efectuados tiene validez.

La oportunidad de investigar en nuevos compuestos antibacterianos que sean de última generación, que tengan la proteína LuxS como su objetivo o en la inhibición de moléculas que interrumpen la comunicación entre bacterias periodonto patógenas, se incrementa con los resultados mostrados y establece pautas de investigaciones posteriores.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baltacioglu E, Aslan M, Sarac O, Saybak A, Yuva P. Analysis of clinical results of systemic antimicrobials combined with nonsurgical periodontal treatment for generalized aggressive periodontitis: A pilot study. *J Can Dent Assoc*, 2011; 77: b97.
2. Serrano C, Torres N, Bejarano A, Cavie M, Castellanos ME. Clinical and microbiological comparison of three non-surgical protocols for the initial treatment of chronic periodontitis. *J Int Acad Periodontol*, 2011; 13(1): 17-26.
3. Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S. Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J Periodontol Res*, 2010; 45(2): 255-261.
4. Díaz Caballero A, Vivas Reyes R, Ahumado Monterrosa M, Arévalo Tovar L, Cabrales Salgado R, Herrera Herrera A. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. *Av Periodon Implantol*, 2011; 23: 195-201.
5. Demmer RT, Papapanou PN, Jacobs DR Jr, Desvarieux M. Evaluating clinical periodontal measures as surrogates for bacterial exposure: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *BMC Med Res Methodol*, 2010; 10: 2.
6. Choi J, Lee SY, Kim K, Choi BK. Identification of immunoreactive epitopes of the *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein in periodontitis and atherosclerosis. *J Periodontol Res*, 2011; 46(2): 240-245.
7. Babnigg G, Joachimiak A. Predicting protein crystallization propensity from protein sequence. *J Struct Funct Genomics*, 2010; 11(1): 71-80.
8. Hamilton N, Huber T. An introduction to protein contact prediction. *Methods Mol Biol*, 2008; 453: 87-104.
9. Chapman HN, Fromme P, Barty A, White TA, Kirian RA, Aquila A et al. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature*, 2011; 470(7332): 73-77.
10. Yamamoto M, Hirata K, Hikima T, Kawano Y, Ueno G. Protein micro-crystallography with a new micro-beam beamline. *Yakugaku Zasshi*, 2010; 130(5): 641-648.
11. Wen HB, Moradian-Oldak J, Zhong JP, Greenspan DC, Fincham AG. Effects of amelogenin on the transforming surface microstructures of bioglass in a calcifying solution. *J Biomed Mater Res*, 2000; 52(4): 762-773.
12. Wen ZT, Nguyen AH, Bitoun JP, Abranches J, Baker HV, Burne RA. Transcriptome analysis of LuxS-deficient *Streptococcus mutans* grown in biofilms. *Mol Oral Microbiol*, 2011; 26(1): 2-18.
13. Reguera G. When microbial conversations get physical. *Trends Microbiol*, 2011; 19(3): 105-113.
14. Dickschat JS. Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep*, 2010; 27(3): 343-369.
15. Jakubovics NS, Kolenbrander PE. The road to ruin: The formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis*, 2010; 16(8): 729-739.
16. Saito Y, Fujii R, Nakagawa KI, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K. Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 2008; 23(1): 1-6.
17. Capriles PV, Guimaraes AC, Otto TD, Miranda AB, Dardenne LE, Degraeve WM. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: Putative drug targets for chagas' disease treatment. *BMC Genomics*, 2010; 11: 610.
18. Zhang JX, Ma HW, Sang M, Hu YS, Liang ZN, Ai HX et al. Molecular structure, expression, cell and tissue distribution, immune evolution and cell proliferation of the gene encoding bovine (*Bos taurus*) TNFSF13 (APRIL). *Dev Comp Immunol*, 2010; 34(11): 1199-1208.
19. Mullins JG, Parker JE, Cools HJ, Togawa RC, Lucas JA, Fraaije BA et al. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One*, 2011; 6(6): e20973.
20. Maulik A, Ghosh H, Basu S. Comparative study of protein-protein interaction observed in PolyGalacturonase-inhibiting proteins from *Phaseolus vulgaris* and glycine max and PolyGalacturonase from *Fusarium moniliforme*. *BMC Genomics*, 2009; 10 Suppl 3: S19.
21. Green RC, Thumser AE, Povey D, Saldanha JW, Potter BS, Palmer RA et al. A comparative study of the single crystal X-ray determination and molecular modelling of the binding of oligomycin to ATP synthase. *Comput Biol Chem*, 2009; 33(3): 189-195.
22. Tsao CY, Wang L, Hashimoto Y, Yi H, March JC, DeLisa MP et al. LuxS coexpression enhances yields of recombinant proteins in *Escherichia coli* in part through posttranscriptional control of GroEL. *Appl Environ Microbiol*, 2011; 77(6): 2141-2152.
23. Ruwandeepika HA, Defoirdt T, Bhowmick PP, Karunasagar I, Bossier P. Expression of virulence genes in luminescent and nonluminescent isogenic vibrios and virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*). *J Appl Microbiol*, 2011; 110(2): 399-406.
24. Schuster M. Global expression analysis of quorum-sensing controlled genes. *Methods Mol Biol*, 2011; 692: 173-187.
25. Palmer AG, Streng E, Jewell KA, Blackwell HE. Quorum sensing in bacterial species that use degenerate autoinducers can be tuned by using structurally identical non-native ligands. *ChemBiochem*, 2011; 12(1): 138-147.
26. Rajan R, Zhu J, Hu X, Pei D, Bell CE. Crystal structure of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) in complex with a catalytic 2-ketone intermediate. *Biochemistry*, 2005; 44(10): 3745-3753.
27. Gao Y, Song J, Hu B, Zhang L, Liu Q, Liu F. The LuxS gene is involved in AI-2 production, pathogenicity, and some phenotypes in *Erwinia amylovora*. *Curr Microbiol*, 2009; 58(1): 1-10.
28. Rader BA, Wreden C, Hicks KG, Sweeney EG, Ottemann KM, Guillemain K. *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. *Microbiology*, 2011; 157(Pt 9): 2445-2455.
29. Kadirvel M, Stimpson WT, Moumene-Affif S, Arsic B, Glynn N, Halliday N et al. Synthesis and bioluminescence-inducing properties of autoinducer (S)-4,5-dihydroxypentane-2,3-dione and its enantiomer. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010; 20(8): 2625-2628.
30. Hardie KR, Heurlier K. Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 2008; 6(8): 635-643.
31. Michelin M, Teixeira S, Ando-Sugimoto E, Lucas S, Mayer M. *Porphyromonas gingivalis* infection at different gestation periods on fetus development and cytokines profile. *Oral Dis*, 2012; 18(7): 648-654.
32. Enersen M. *Porphyromonas gingivalis*: A clonal pathogen?: Diversities in housekeeping genes and the major fimbriae gene. *J Oral Microbiol*, 2011; 3: 683-690.
33. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*, 2011; 10(5): 497-506.
34. Burgess NA, Kirke DF, Williams P, Winzer K, Hardie KR, Meyers NL et al. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and Haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology*, 2002; 148(Pt 3): 763-772.
35. Aduse-Opoku J, Davies NN, Gallagher A, Hashim A, Evans HE, Rangarajan M et al. Generation of lys-gingipain protease activity in *Porphyromonas gingivalis* W50 is independent of Arg-gingipain protease activities. *Microbiology*, 2000; 146(Pt 8): 1933-1940.
36. McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS, Lamont RJ. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: Autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 2003; 185(1): 274-284.
37. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2006; Chapter 5: Unit 56.
38. Fiser A, Do RK, Sali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci*, 2000; 9(9): 1753-1773.
39. Altschul SF. Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. *J Mol Biol*, 1991; 219(3): 555-565.
40. Mount DW. Using PAM matrices in sequence alignments. *CSH Protoc*, 2008; 2008: pdb top38.
41. Mount DW. Using BLOSUM in sequence alignments. *CSH Protoc*, 2008; 2008: pdb top39.
42. Mount DW. Comparison of the PAM and BLOSUM amino acid substitution matrices. *CSH Protoc*, 2008; 2008: pdb ip59.
43. Mount DW. Using gaps and gap penalties to optimize pairwise sequence alignments. *CSH Protoc*, 2008; 2008: pdb top40.
44. Ruzhenikov SN, Das SK, Sedelnikova SE, Hartley A, Foster SJ, Horsburgh MJ et al. The 1.2 Å structure of a novel quorum-sensing protein, *Bacillus subtilis* LuxS. *J Mol Biol*, 2001; 313(1): 111-122.
45. Jain AN. Surfex: Fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem*, 2003; 46(4): 499-511.
46. Sweet CR, Hampton SS, Skeel RD, Izaguirre JA. A separable shadow Hamiltonian hybrid Monte Carlo method. *J Chem Phys*, 2009; 131(17): 174106.
47. Lewis HA, Furlong EB, Laubert B, Eroshkina GA, Batiyenko Y, Adams JM et al. A structural genomics approach to the study of quorum sensing: Crystal structures of three LuxS orthologs. *Structure*, 2001; 9(6): 527-537.
48. Janes RW. Bioinformatics analyses of circular dichroism protein reference databases. *Bioinformatics*, 2005; 21(23): 4230-4238.
49. Paramasivan M, Sankaran G, Sethuraman N, Devadoss DS, Thangavelu S, Gangatharan M. Molecular modelling of urease accessory interaction proteins of *Helicobacter pylori* J 99 and predicting an interruption in interaction by Vigna radiata Defensins. *Bioinformation*, 2011; 5(10): 410-415.
50. Eisenberg D, Luthy R, Bowie JU. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol*, 1997; 277: 396-404.
51. Paital B, Kumar S, Farmer R, Tripathy NK, Chainy GB. *In silico* prediction and characterization of 3D structure and binding properties of catalase from the commercially important crab, *Scylla serrata*. *Interdiscip Sci*, 2011; 3(2): 110-120.
52. Sippl MJ. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, 1993; 17(4): 355-362.
53. Cho HS, Dashdorj N, Schotte F, Graber T, Henning R, Anfirud P. Protein structural dynamics in solution unveiled via 100-ps time-resolved x-ray scattering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107(16): 7281-7286.
54. Vlachakis D. Theoretical study of the Usutu virus helicase 3D structure, by means of computer-aided homology modelling. *Theor Biol Med Model*, 2009; 6: 9.
55. Jain AN. Morphological similarity: A 3D molecular similarity method correlated with protein-ligand recognition. *J Comput Aided Mol Des*, 2000; 14(2): 199-213.
56. Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J Comput Aided Mol Des*, 1997; 11(5): 425-445.
57. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 1997; 267(3): 727-748.
58. Muegge I, Martin YC. A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: A simplified potential approach. *J Med Chem*, 1999; 42(5): 791-804.
59. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol*, 1982; 161(2): 269-288.
60. Miele M, Costantini S, Colonna G. Structural and functional similarities between osmotin from *Nicotiana tabacum* seeds and human adiponectin. *PLoS One*, 2011; 6(2): e16690.
61. Pollastri G, Martin AJ, Mooney C, Vullo A. Accurate prediction of protein secondary structure and solvent accessibility by consensus combiners of sequence and structure information. *BMC Bioinformatics*, 2007; 8: 201.
62. Venselaar H, Joosten RP, Vrolijk B, Baakman CA, Hekkelman ML, Krieger E et al. Homology modelling and spectroscopy, a never-ending love story. *Eur Biophys J*, 2010; 39(4): 551-563.
63. Alber F, Forster F, Korkin D, Topf M, Sali A. Integrating diverse data for structure determination of macromolecular assemblies. *Annu Rev Biochem*, 2008; 77: 443-477.
64. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*, 2008; 79(8 Suppl): 1592-1600.
65. Maia FR, Ekeberg T, Timneanu N, van der Spoel D, Hajdu J. Structural variability and the incoherent addition of scattered intensities in single-particle diffraction. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2009; 80(3 Pt 1): 031905.
66. Tesson B, Genet MJ, Fernández V, Degand S, Rouxhet PG, Martin-Jezequel V. Surface chemical composition of diatoms. *ChemBiochem*, 2009; 10(12): 2011-2024.