



24.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN  
Enfermedades infecciosas

## **DESAFIANDO AL PATÓGENO PERIODONTAL PORPHYROMONAS GINGIVALIS A TRAVÉS DE LA SORTASA DE SU SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IX**

**Dr. F. Xavier Gomis Rüth**

Institut Biologia Molecular de Barcelona – CSIC

## 1. Resumen

El microbioma oral humano incluye más de 6 millones de células bacterianas agrupadas en una comunidad homeostática estable. La perturbación de esta comunidad, p. ej. mediante antibióticos, conduce a disbiosis, en la que predominan las especies proteolíticas gramnegativas. Estas causan destrucción de los tejidos, inflamación y enfermedades como la caries y la periodontitis (PD). Esta última se encuentra entre las enfermedades infecciosas más comunes de la humanidad y conduce a la destrucción de tejidos y la pérdida de dientes. Entre las especies causantes se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, que además está implicada en una serie de enfermedades sistémicas. Esta bacteria utiliza un sistema de secreción de tipo IX (T9SS), de 18 proteínas, para exportar al menos 35 proteínas al espacio extracelular, incluidos varios factores de virulencia. Por tanto, el T9SS se considera un objetivo terapéutico atractivo para combatir *P. gingivalis*.

La señal de reconocimiento para la exportación mediante el T9SS es un dominio proteico C-terminal conservado, que es cortado durante la translocación por una cisteína peptidasa clave con actividad de tipo sortasa llamada *PgPorU*.

Consistentemente, la supresión de *PgPorU* abroga la función del T9SS y conduce a la acumulación de proteínas inmaduras en la célula. *PgPorU* es una gran proteína multidominio de 128 kDa, de módulos y arquitectura desconocidos, que está anclada en la superficie celular.

Dado su papel clave en la función de T9SS, la estructura y la función de *PgPorU* se determinaron en colaboración con el grupo del profesor Jan Potempa, de la Universidad de Cracovia (Polonia), para desvelar su mecanismo molecular y proporcionar un molde para el diseño de inhibidores específicos.

Con el apoyo de la Fundació La Marató de TV3, determinamos que *PgPorU* transita entre monómeros activos y dímeros latentes y resolvimos la estructura cristalina del dímero de  $\sim 260$  kDa. *PgPorU* tiene una forma alargada de  $\sim 130$  Å de longitud y consta de siete dominios. Los tres primeros forman un cúmulo N-terminal entrelazado, implicado probablemente en la unión a sustrato. Les siguen un dominio catalítico similar a la gingipaína (CD), dos dominios similares a la inmunoglobulina (IGL) y el CTD. Dentro de la primera IGL, una larga "horquilla  $\beta$  latente" sobresale  $\sim 30$  Å de la

superficie para formar un barril  $\beta$  intermolecular con cadenas  $\beta$  del CD simétrico, que se encuentra en una conformación latente. El modelado por homología del CD activo, seguido de su validación *in vivo* mediante una cohorte de cepas mutantes, reveló que *PgPorU* se transporta y funciona como monómero mediante una díada catalítica (C690/H657). Así pues, la dimerización es un mecanismo intermolecular para la regulación de *PgPorU*, para prevenir su actividad prematura hasta unirse al complejo de unión. Los resultados obtenidos abren el camino para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos basados en la estructura para hacer frente a la periodontitis.

Por último, los recursos humanos y fungibles aportados por la Fundació La Marató de TV3 nos han permitido llevar a cabo algunos proyectos paralelos relacionados con otros factores de virulencia de *P. gingivalis* y otros periodontopatógenos. Son temas, por tanto, muy relacionados con el de la propuesta. Las proteínas estudiadas incluyen la peptidilarginina deiminasa y PorZ de *P. gingivalis*, así como la myrolisina y el sistema KLIKK/potempina de *Tannerella forsythia*. Asimismo, estudiamos otras proteínas bacterianas, como un posible inhibidor de la aureolisina de *Staphylococcus aureus*, que es un factor de virulencia de esta bacteria patógena; la fragilisina-3 de *Bacteroides fragilis* enteropatógena; y un dominio de unión en el ADN de la proteína ICEBs1 de *Bacillus subtilis*. Asimismo, pudimos desarrollar otros temas más lejanos relacionados con la producción y purificación recombinante de proteínas en el contexto de la biología estructural y los análisis funcionales. Aquí podemos mencionar el factor de crecimiento transformador humano  $\beta 2$ , la  $\alpha 2$ -macroglobulina humana, los complejos inhibidores de astacina y meprina  $\beta$  con fetuína B, la astacina de *Limulus polyphemus*, la neprosina de *Nepenthes ventrata*, un modulador de la actividad de las metaloproteínas matriciales (RECK), anticuerpos sintéticos diseñados *de novo* y el ADAMTS-13 humana.

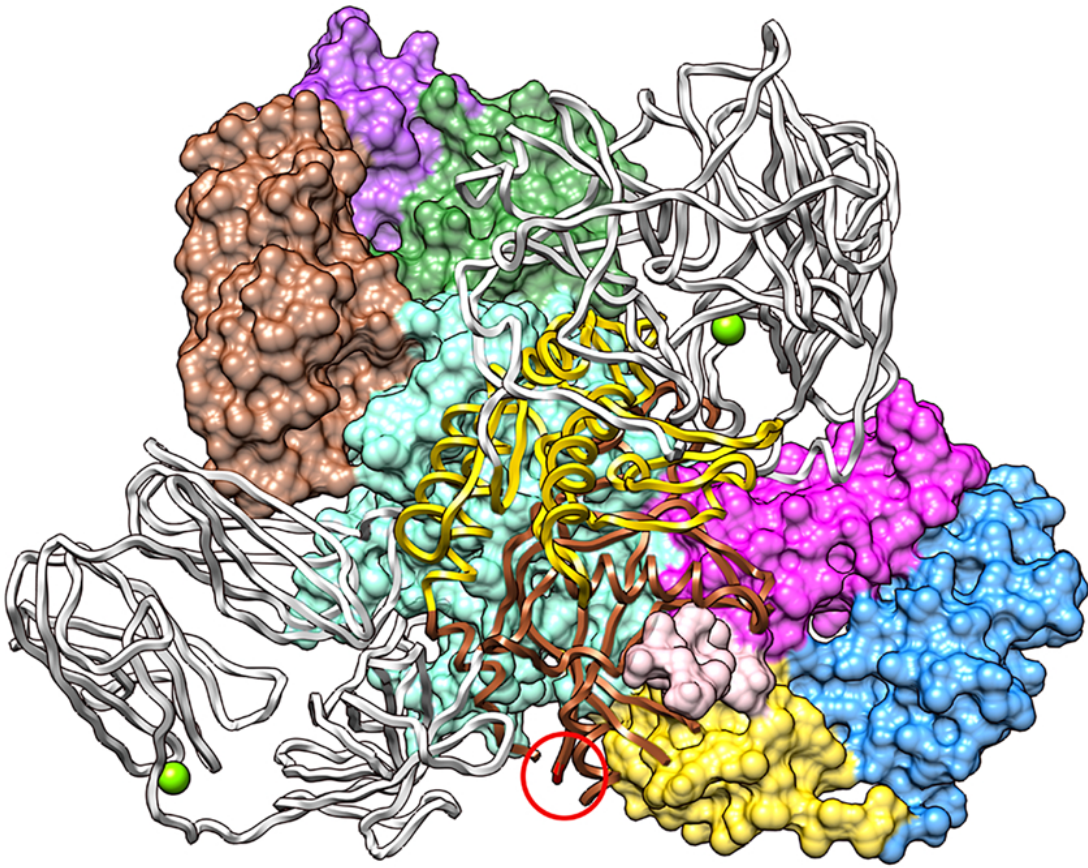


Diagrama de cinta que representa el *PgPorU* dimérico en su estado latente.

## 2. Bibliografía científica generada

En las publicaciones siguientes se hizo constar explícitamente el soporte financiero recibido de la Fundació La Marató de TV3 mediante la ayuda 201815.

### Publicación principal del proyecto

(1) Mizgalska D, Goulas T, Rodríguez-Banqueri A, Veillard F, Madej M, Małecka E, Szczesniak K., Książek M, Widziółek M, Guevara T, Eckhard U, Solà M, Potempa J, **Gomis-Rüth FX**.\*

*Intermolecular latency regulates the essential C-terminal signal peptidase and sortase of the P. gingivalis Type-IX Secretion System.*

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **118**, e2103573118. 2021.

Nota de prensa de la institución: <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/cientificos-del-csic-descifran-un-mecanismo-de-ataque-de-la-principal-bacteria>.

Amplia cobertura en medios catalanes y españoles, tanto impresos como en línea, incluyendo *Diari de Girona*, *El Periódico de Catalunya*, *La Vanguardia*, *La República*, *Diario Médico*, *MSN*, así como en entrevistas de radio (Radio Ecça, Canàries).

Previsualización (<https://www.eldentistamoderno.com/revista-el-dentista-moderno-no63-p-72>) y artículo completo (<https://www.eldentistamoderno.com/revista-el-dentista-moderno-no64-pp-40-42>) en *El Dentista Moderno*.

### Publicaciones secundarias del proyecto

(2) **Gomis-Rüth FX**,\* Stöcker W.

*Structural and evolutionary insights into astacin metallopeptidases.*

**Front. Molec. Biosci.**, **9**, 1080836. 2023.

(3) Książek M, Goulas T, Mizgalska D, Rodríguez-Banqueri A, Eckhard U, Veillard F, Waligórska I, Benedyk-Machaczka M, Sochaj-Gregorczyk AM, Madej M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Cuppari A, Arolas JL, de Diego I, López-Pelegrín M, Garcia-Ferrer I, Guevara T, Dive V, Zani ML, Moreau T, Potempa J, **Gomis-Rüth FX**.\*

*A unique network of attack, defence and competence on the outer membrane of the periodontitis pathogen Tannerella forsythia.*

**Chem. Sci.**, **14**, 869-888. 2023.

Nota de prensa de la institución en: [www.csic.es/es/actualidad-del-csic/un-estudio-del-csic-aporta-nuevas-pistas-sobre-las-causas-de-la-periodontitis](http://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/un-estudio-del-csic-aporta-nuevas-pistas-sobre-las-causas-de-la-periodontitis) i destacado en el

*Butlletí CSIC a Catalunya*, Vol 175, 30.1.2023–5.2.2023

(delegacion.catalunya.csic.es/un-trabajo-del-csic-aporta-nuevas-pistas-sobre-las-causas-de-la-periodontitis/?lang=ca).

(4) Chidyausiku TM, Mendes SR, Klima JC, Nadal M, Eckhard U, Roel-Touris J, Houliston S, Guevara T, Haddox HK, Moyer A, Arrowsmith CH, **Gomis-Rüth FX**,\* Baker D, Marcos E.

*De novo design of immunoglobulin-like domains.*

**Nat. Commun.**, **13**, 5661. 2022.

(5) Jiménez-Alesanco A, Eckhard U, Asencio del Río M, Vega S, Guevara T, Vázquez-Campoy A, **Gomis-Rüth FX**,\* Abián O.

*Repositioning small molecule drugs as allosteric inhibitors of the BFT-3 toxin from enterotoxigenic Bacteroides fragilis.*

**Prot. Sci.**, **31**, e4427. 2022.

(6) del Amo-Maestro L, Mendes SR, Rodríguez-Banqueri A, Garzon-Flores L, Girbal M, Rodríguez-Lagunas MJ, Guevara T, Franch A, Pérez-Cano FJ, Eckhard U, **Gomis-Rüth FX**.\*

*Molecular and in vivo studies of a glutamate-class prolyl-endopeptidase for coeliac disease therapy.*

**Nat. Commun.**, **13**, 4446. 2022.

Nota de prensa de la institución: <https://www.csic.es/es/actualidad-del-csic/identifican-una-molecula-que-podria-servir-para-tratar-la-celiaquia>. Amplia cobertura en medios catalanes, gallegos, vascos y españoles, tanto audiovisuales e impresos como en línea, incluyendo *Diari de Girona*, *La Voz de Galicia*, *Segre*, *El Progreso*, *La Vanguardia*, *Cambio 16*, *Diario de Jerez*, *Diario de Cádiz*, *Diario de Sevilla*, *El Mundo Deportivo*, *Sport*, *El Periódico de Aragón*, *Diario de Mallorca*, *Diario de Ibiza*, *El Periódico*, RTVE, LaSexta, TeleMadrid, EFE, etc. Entrevista de radio en Onda Cero (Madrid, España). Destacado en *Quickcuts*, la publicación oficial de la International Proteolysis Society ([https://www.protease.org/QuickCuts/QuickCuts\\_2022\\_November.pdf](https://www.protease.org/QuickCuts/QuickCuts_2022_November.pdf)).

(7) Mendes SR, Eckhard U, Rodríguez-Banqueri A, Guevara T, Czermak P, Marcos E, Vilcinskis A, **Gomis-Rüth FX**.\*

*An engineered protein-based submicromolar competitive inhibitor of the Staphylococcus aureus virulence factor aureolysin.*

**Comp. Struct. Biotechnol. J.**, **20**, 534-544. 2022.

(8) Caliandro R, de Diego I, **Gomis-Rüth FX**.\*

*Crystal structure report of the ImmR transcriptional regulator DNA-binding domain of the Bacillus subtilis ICEBs1 transposon.*

**Sci. Rep.**, **12**, 5258. 2022.

(9) Luque D, Goulas T, Mata CP, Mendes SR, **Gomis-Rüth FX**,\* Castón JR.

*Cryo-EM structures shows the mechanistic basis of pan-peptidase inhibition by human  $\alpha_2$ -macroglobulin.*

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **119**, e2200102119. 2022.

(10) Madej M, Nowakowska Z, Ksiazek M, Lasica AM, Mizgalska D, Nowak M, Jacula A, Bzowska M, Scavenius C, Enghild JJ, Aduse-Opoku J, Curtis MA, **Gomis-Rüth FX**,\* Potempa J.

*PorZ, an essential component of the type IX secretion system of Porphyromonas gingivalis, delivers anionic lipopolysaccharide to the PorU sortase for transpeptidase processing of T9SS cargo proteins.*

**mBio**, **12**, e02262-20. 2021

(11) Eckhard U, Körschgen H, von Wiegen N, Stöcker W, **Gomis-Rüth FX**.\*

*The crystal structure of a 250-kDa heterotetrameric particle explains inhibition of sheddase mepripin  $\beta$  by endogenous fetuin-B.*

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **118**, e2023839118. 2021.

(12) del Amo-Maestro L, Sagar A, Pompach P, Goulas T, Scavenius C, Ferrero DS, Castrillo-Briceño M, Taulés M, Enghild JJ, Bernadó P, **Gomis-Rüth FX**.\*

*An integrative structural biology analysis of von Willebrand factor binding and processing by ADAMTS-13 in solution.*

**J. Mol. Biol.**, **433**, 166954. 2021.

- (13) Guevara T, Rodríguez-Banqueri A, Ksiazek M, Potempa J, **Gomis-Rüth FX.\***  
*Structure-based mechanism of cysteine-switch latency and of catalysis by pappalysin-family metallopeptidases.*  
**IUCrJ**, **7**, 18-29. 2020. Scientific commentary in the same issue (**IUCrJ**, **7**, 3-4, 2020) and in **IUCr Newsletter**, Vol. 28(1), 2020: E.S. Radisky: Mirolysin structures open a window on gum diseases. See [https://www.iucr.org/news/newsletter/etc/articles?issue=147154&result\\_138339\\_result\\_page=11](https://www.iucr.org/news/newsletter/etc/articles?issue=147154&result_138339_result_page=11).
- (14) Mendes SR, del Amo-Maestro L, Marino-Puertas L, De Diego I, Goulas T, **Gomis-Rüth FX.\***  
*Analysis of the inhibiting activity of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) on matrix metalloproteinases.*  
**Sci. Rep.**, **10**, 6317. 2020.
- (15) Bereta G, Goulas T, Madej M, Bielecka E, Solà M, Potempa J, **Gomis-Rüth FX.\***  
*Structure, function and inhibition of a genomic/clinical variant of Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase.*  
**Prot. Sci.**, **28**, 478-486 (destacado en la cubierta del número en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.3584>). 2019.
- (16) Cuppari A, Körschgen H, Fahrenkamp D, Schmitz C, Guevara T, Karmilin K, Kuske M, Olf M, Ditzel E, Yiallourous I, de Sanctis D, Goulas T, Weiskirchen R, Jahnen-Dechent W, Floehr J, Stöcker W, Jovine L, **Gomis-Rüth FX.\***  
*Structure of mammalian plasma fetuin-B and its mechanism of selective metallopeptidase inhibition.*  
**IUCrJ**, **6**, 317-330. 2019.
- (17) Guevara T, Rodríguez-Banqueri A, Lasica AM, Ksiazek M, Potempa BA, Potempa J, **Gomis-Rüth FX.\***  
*Structural determinants of inhibition of Porphyromonas gingivalis gingipain K by KYT-36, a potent, selective, and bioavailable peptidase inhibitor.*  
**Sci. Rep.**, **9**, 4935. 2019.



(18) del Amo-Maestro L, Marino-Puertas L, Goulas T, **Gomis-Rüth FX**.\*

*Recombinant production, purification, crystallization, and structure analysis of human transforming growth factor  $\beta$ 2 in a new conformation.*

**Sci. Rep.**, **9**, 8660. 2019.

(19) Marino-Puertas L, del Amo-Maestro L, Taulés M, **Gomis-Rüth FX**,\* Goulas T.

*Recombinant production of human  $\alpha$ <sub>2</sub>-macroglobulin variants and interaction studies with recombinant G-related  $\alpha$ <sub>2</sub>-macroglobulin binding protein and latent transforming growth factor- $\beta$ <sub>2</sub>.*

**Sci. Rep.**, **9**, 9186. 2019.

(20) Guevara T, Körschgen H, Cuppari A, Schmitz C, Kuske M, Yiallourous I, Floehr J, Jahnen-Dechent W, Stöcker W, **Gomis-Rüth FX**.\*

*The C-terminal region of human plasma fetuin-B is dispensable for the raised-elephant-trunk mechanism of inhibition of astacin metallopeptidases.*

**Sci. Rep.**, **9**, 14683. 2019.