ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-022.7+616-097+577.112
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-104-115

Поступила в редакцию 27.12.2023
Received 27.12.2023

С. П. Рубникович, В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

НОВЫЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИНЫ ОТ КАРИЕСА ЗУБОВ

Аннотация. Геномы бактерий *Streptococcus mutans* и *Streptococcus sobrinus*, вызывающих кариес зубов, в настоящее время полностью секвенированы. В то же время пространственные структуры полноразмерных поверхностных белков данных микроорганизмов, с помощью которых они прикрепляются к поверхности зубов, покрытых слюной, до сих пор инструментально не определены. Имеется ряд экспериментальных работ по использованию этих белков в процессе разработки вакцины от кариеса, однако коммерчески доступной вакцины от кариеса на данный момент нет. Для разработки эффективной и безопасной вакцины от кариеса необходимо провести целый ряд экспериментов *in silico*, предшествующих экспериментам *in vitro*, а тем более *in vivo*. Сегодня такой подход не только является общепризнанным, но и позволяет существенно снизить стоимость экспериментов и продолжительность времени на доклиническом и клиническом этапах.

Цель исследования – отбор антигена для последующего молекулярного моделирования уникального пептида для разработки вакцины от кариеса зубов.

По нашей гипотезе, в качестве антигена для разработки вакцины от кариеса необходимо использовать короткий фрагмент поверхностного белка (пептид) *Streptococcus mutans* и/или *Streptococcus sobrinus*, гомологичность которых по аминокислотной последовательности составляет 84,8 %. При этом пространственная структура этого пептида должна соответствовать пространственной структуре соответствующего фрагмента в полноразмерном белке. Кроме того, отобранный фрагмент белка, который войдет в состав вакцинного пептида, должен быть доступен антителам, т. е. располагаться на поверхности белка и определяться как В-клеточный линейный и пространственный эпитоп. Вакцинный пептид может состоять из наиболее стабильных фрагментов богатых аланином и пролином областей поверхностного белка *Streptococcus mutans* и/или *Streptococcus sobrinus* для взаимной стабилизации пространственной структуры.

Ключевые слова: кариес зубов, адгезин AgI/II, антиген, вакцинный пептид, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*

Для цитирования: Рубникович, С. П. Новый подход к разработке вакцины от кариеса зубов / С. П. Рубникович, В. В. Побойнев, В. В. Хрусталёв // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 104–115. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-104-115

Sergey P. Rubnikovich, Victor V. Poboinev, Vladislav V. Khrustalev

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

A NEW APPROACH IN THE DEVELOPMENT OF A DENTAL CARIES VACCINE

Abstract. The genomes of the bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, which cause dental caries, currently have been fully sequenced. However, the secondary and tertiary structures of the full-size surface proteins of these microorganisms, by which they attach to the surface of teeth covered with saliva, have not been instrumentally determined at the moment. There are a number of experimental studies on the use of these proteins in the process of developing a dental caries vaccine. However, there is currently no commercially available dental caries vaccine.

The aim of the study was to choose an antigen for subsequent molecular modeling of a unique peptide for the development of a dental caries vaccine.

To develop an effective and safe dental caries vaccine, it is necessary to perform a number of experiments *in silico*, preceding experiments *in vitro* and *in vivo*. Today, this approach is not only generally recognized, but also allows to significantly reduce the cost of experiments and time at the preclinical and clinical studies. According to our hypothesis, as an antigen for the development of a dental caries vaccine, it is necessary to use a short fragment of the surface protein (a peptide) of *Streptococcus mutans* and/or *Streptococcus sobrinus*, whose homology in amino acid sequence is 84.8 %, the spatial structure of which should correspond to the spatial structure of the corresponding fragment in a full-sized protein. In addition, the selected protein fragment, which will be part of the vaccine peptide, must be available to antibodies, i. e. located on the surface of the protein and defined as a B-cell linear and spatial epitope. Also, according to our hypothesis, the vaccine peptide may consist of the most stable fragments of alanine and proline rich regions of the surface protein of *Streptococcus mutans* and/or *Streptococcus sobrinus* for mutual stabilization of the spatial structure.

Keywords: dental caries, adhesin AgI/II, antigen, vaccine peptide, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*

© Рубникович С. П., Побойнев В. В., Хрусталёв В. В., 2024

For citation: Rubnikovich S. P., Poboinev V. V., Khrustalev V. V. A new approach in the development of a dental caries vaccine. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 2, pp. 104–115 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-2-104-115

Введение. Согласно клиническому протоколу «Диагностика и лечение пациентов (взрослое население) с кариесом постоянных зубов», утвержденному постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 11.01.2023 № 4, под термином «кариес постоянных зубов» понимают инфекционное заболевание с прогрессирующей деструкцией твердых тканей зуба, начинающееся деминерализацией на наружной поверхности эмали или оголением цемента [1]. В международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра кариес зубов имеет шифр К02. Кариес зубов является наиболее распространенным заболеванием полости рта во всем мире. В 2015 г. нелеченым кариесом страдали около 2,4 млрд человек [2]. Распространенность же кариеса в целом во всем мире приближается к 100 %. Кариес зубов при несвоевременном и/или неправильном лечении может стать причиной развития воспалительных заболеваний пульпы и периодонта, потери зубов, развития гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, а также представляет собой потенциальные очаги интоксикации и инфекционной сенсибилизации организма.

Согласно расширенной базе данных микробиома полости рта человека (eHOMD), во рту и в аеродигестивном тракте, включая глотку, носовые ходы, придаточные пазухи носа и пищевод, обитает 774 вида бактерий, причем только 58 % из них имеют официальные названия (https://www.homd.org/). Кроме бактерий во рту человека «живут» грибы, вирусы, археи и простейшие [3]. Эти микроорганизмы образуют сложное экологическое сообщество, которое влияет на здоровье полости рта и всего организма в целом. На сегодняшний день известно, что кариес зубов вызывают главным образом бактерии *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) и *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) [4]. Обе бактерии одинаково вирулентны, однако *S. mutans* чаще выделяется из полости рта [5]. *S. mutans* относится к группе из семи близкородственных видов, которые в совокупности были названы стрептококками *mutans* [6]. Несмотря на применение различных стратегий, заболеваемость кариесом остается стабильно высокой на протяжении последних десятилетий [7].

При развитии кариеса зубов можно выделить ряд ключевых этапов. С помощью адгезина (белок AgI/II) *S. mutans* прикрепляется к поверхности зубов, покрытых слюной. Глюкозилтрансферазы (GTFs) ответственны за выработку внеклеточных глюканов, которые, как полагают, играют ключевую роль в образовании зубного налета из-за их способности прилипать к гладким поверхностям и опосредовать агрегацию бактериальных клеток и остатков пищи. Глюкансвязывающие белки (GBPs) способствуют взаимодействию синтезированных глюканов с бактериями и формированию биопленки на поверхности зубов.

Коммерчески доступной вакцины от кариеса на сегодняшний день не существует, однако исследования по ее разработке ведутся уже более 40 лет [5]. В первые годы исследований вакцины создавались с использованием целых клеток *S. mutans* или *S. sobrinus*, однако исследования *in vivo* и *in vitro* выявили минимальную пользу таких вакцин и наличие побочных эффектов [8, 9]. Кроме того, были попытки создания субъединичных вакцин, ДНК-вакцин, проведения пассивной иммунизации [5]. В настоящее время одним из основных направлений является разработка синтетических вакцин.

Развитие кариеса начинается с прикрепления стрептококков к поверхности зубов. Для этого у них имеются поверхностные белки: AgI/II (PAc или P1) у *S. mutans* и SpaA (PAg) у *S. sobrinus*. Кроме указанных (наиболее распространенных) названий данных белков, можно встретить и другие обозначения, такие как антиген B [10], SR [11], IF [12] и MSL-1 [13]. Штаммы бактерий, нокаутные по гену pac, кодирующему данный белок, демонстрировали меньшую кариесогенную активность у крыс [14]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что антитела, вырабатываемые против этих адгезинов, предотвращают прилипание стрептококков к покрытым слюной зубам. Иммунизация интактным AgI/II может защитить грызунов, приматов и людей от кариеса зубов, вызванного *S. mutans* [15]. Аналогичным образом иммунизация с использованием SpaA защищала

крыс от кариеса, вызванного *S. sobrinus* [16]. Показано, что подкожная иммунизация синтетическим пептидом, полученным из богатой аланином области адгезина AgI/II *S. mutans*, индуцировала выработку высокого уровня IgG [17]. Однако исследования последних лет показали, что главный поверхностный адгезин *S. mutans* проявляет относительно слабую иммуногенность, вызывая низкий уровень иммунного ответа [2].

На сегодняшний день установлено, что главный поверхностный антиген *S. mutans* состоит из 1565 аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки 1–38 входят в состав сигнального пептида, N-концевой фрагмент белка (аминокислотные остатки 60–550) содержит три полных и один неполный повтор последовательности в богатой аланином области, С-концевая область белка (аминокислотные остатки 800–1540) включает богатые пролином повторы (три полных и один неполный), придающие гидрофильность поверхностному белку AgI/II. Аминокислотные остатки 1537–1556 формируют трансмембранный домен. Между богатыми аланином и пролином областями находится промежуточный сегмент (область V), где находится большинство вариаций аминокислотных остатков, по которым различают различные штаммы бактерии [18]. Богатая аланином область и область V содержат эпитопы адгезии, которые непосредственно взаимодействуют со слюнными агглютининами [19]. Главный поверхностный антиген *S. sobrinus* имеет схожее строение с аналогичным белком *S. mutans*. SpaA состоит из 1528 аминокислотных остатков, а также из богатой аланином области на N-конце белка и богатой пролином области на С-конце, однако SpaA включает только два повтора аминокислотных последовательностей в богатой пролином области [20].

Помимо экспериментов на лабораторных животных, были проведены и мелкомасштабные испытания на людях, которые показали, что повышение уровня секреторного IgA в слюне в некоторых случаях препятствовало колонизации полости рта *S. mutans* [21]. Хотя эти эффекты были относительно кратковременными, изменение состава, дозы, способа и частоты введения антигена может значительно увеличить интенсивность и продолжительность иммунного ответа. Это говорит о необходимости дальнейших клинических испытаний, так как в сочетании с устоявшимися методами профилактики кариеса вакцины могут внести весьма ценный вклад в борьбу с данным заболеванием. Кроме низкой иммуногенности предложенных вакцин, имеются сведения о перекрестной реактивности вырабатываемых антител с тканями сердца и скелетных мышц человека [21, 22]. Есть данные, что при клапанном эндокардите, вызванном оральными стрептококками, в 7 % случаев причиной были бактерии *S. mutans*, выделенные из крови пациентов с инфекционным эндокардитом [23]. Причиной низкой иммуногенности исследуемых вакцин могло быть то, что в качестве антигена использовались не отдельные наиболее стабильные фрагменты главного поверхностного адгезина *S. mutans*, а большие фрагменты, соответствующие богатым аланином и/или пролином областям [6, 24]. Для создания эффективной вакцины необходимо использовать только те иммуногенные фрагменты ключевых белков *S. mutans* и *S. sobrinus*, структура которых является устойчивой. Трудности в разработке эффективной высокоиммуногенной вакцины от кариеса обусловлены тем, что на сегодняшний день еще не определено точное строение главного поверхностного адгезина *S. mutans* и *S. sobrinus*. Повысить же иммуногенность имеющихся вакцин исследователи пытаются при помощи адъювантов. В 2023 г. установлено, что введение поверхностного антигена *S. mutans* с наночастицами ZIF-8 повышает иммунный ответ по сравнению с введением исключительно поверхностного антигена *S. mutans*.

Несмотря на то что попытки разработки вакцины от кариеса зубов ведутся уже не одно десятилетие, готового продукта до сих пор нет. Данное обстоятельство говорит о том, что необходимо применить принципиально новый подход для разработки вакцины. Можно использовать гибридные антигены, состоящие из нескольких структурно устойчивых фрагментов одного или нескольких белков. При этом антитела, выработанные на них, не должны перекрестно реагировать с другими тканями организма человека.

Цель данной статьи – отбор антигена с целью последующего молекулярного моделирования уникального пептида для разработки вакцины от кариеса зубов.

Материалы и методы исследования. Для прогнозирования вторичной структуры белка AgI/II *S. mutans* и определения ее стабильности использовалась аминокислотная последовательность

данного белка, полученная из базы Uniprot (ID: P11657) [25]. Вторичная и третичная структура полноразмерного белка AgI/II *S. mutans* инструментальными методами на данный момент не определена, однако в базе Uniprot депонирована структура, определенная программой AlphaFold [26]. Стабильность структуры адгезина AgI/II *S. mutans* оценивали и при помощи оригинальных алгоритмов – PentUnFOLD [27] и PentaFOLD [28]. Для определения степени гомологичности адгезинов *S. mutans* и *S. sobrinus* использовали аминокислотную последовательность *S. sobrinus* с Uniprot ID P21979. Гомологичность определяли при помощи программы SSEARCH, выполняющей выравнивание белков по методу Smith–Waterman [29]. Для оценки качества имеющихся 3D-моделей адгезина AgI/II *S. mutans* были использованы веб-серверы VERIFY 3D и PROCHECK. Сервер VERIFY 3D проверяет соответствие 3D-структуры белка его аминокислотной последовательности (1D-структура) путем присвоения белку структурного класса на основании наличия различных типов элементов вторичной структуры и их расположения в пространстве и сравнения с показателями «правильных» белковых структур [30]. Сервер PROCHECK проверяет стереохимическое качество структуры белка (пептида) путем анализа геометрии каждого аминокислотного остатка и общей геометрии молекулы белка (пептида) [31].

Результаты и их обсуждение. По нашей гипотезе, для усиления иммунного ответа необходимо использовать уникальную третичную структуру главного поверхностного адгезина вызывающих кариес зубов стрептококков, на которой богатая аланином область пространственно сближена с богатой пролином областью и формирует с ней многочисленные взаимодействия (рис. 1) [32].

Трудность заключается в том, что в составе синтетического пептида должна воспроизводиться именно такая же вторичная и третичная структура, как и в полноразмерном белке, – альфа-спираль, формирующая связи с полипролиновой спиралью. Однако в подобных пептидах вторичная структура воспроизводится именно благодаря взаимодействиям, формируемым между остатками тирозина из альфа-спирального фрагмента и пролина из полипролинового фрагмента пептида. Более того, установлено, что вместо остатков тирозина можно включать остатки триптофана [33].

В настоящее время известна аминокислотная последовательность адгезина AgI/II *S. mutans*, однако отсутствуют инструментально полученные сведения о вторичной и третичной структуре полноразмерного белка. В Protein Data Bank имеется информация о структуре лишь фрагментов

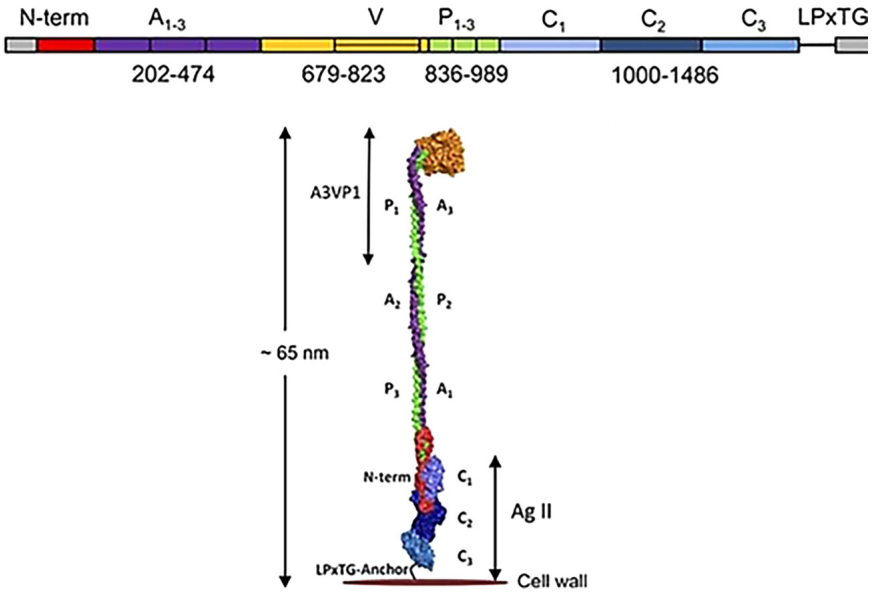


Рис. 1. Схема строения поверхностного адгезина AgI/II *S. mutans*.
$A_{1–3}$ – область, богатая аланином, $P_{1–3}$ – область, богатая пролином

Fig. 1. Scheme of the adhesin AgI/II of *S. mutans*.
$A_{1–3}$ – alanine-enriched area, $P_{1–3}$ – proline-enriched area

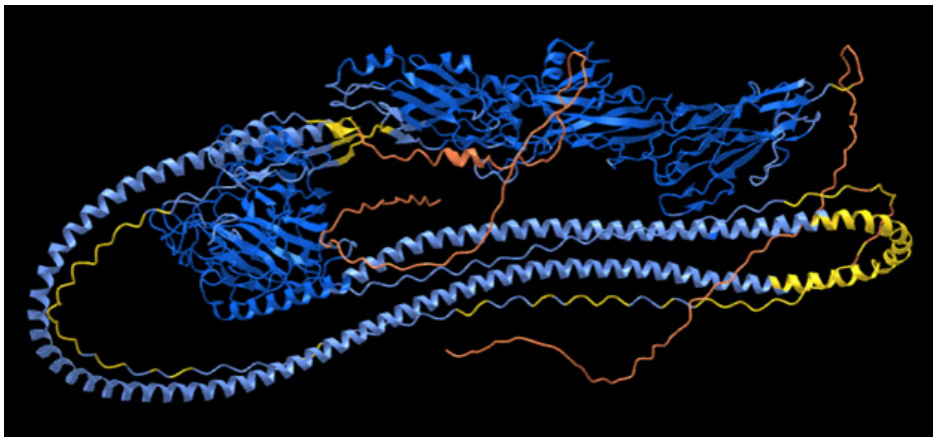


Рис. 2. Пространственная структура адгезина AgI/II *S. mutans.* Оранжевым цветом обозначены фрагменты белка с крайне низкой степенью достоверности структуры, желтым – с низкой степенью достоверности, голубым – с высокой, синим – с очень высокой степенью достоверности

Fig. 2. 3D structure of adhesin AgI/II *S. mutans.* The fragments of the protein with extremely low confidence of the structure are indicated in orange, those with a low confidence – in yellow, those with high confidence – in light blue, those with very high confidence – in blue

адгезина AgI/II *S. mutans*, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа: 1JMM (аминокислотная последовательность полноразмерного белка – 463–839), 3OPU (1154–1492), 3QE5 (991–1485), 6TZL (446–848), 6UBV (446–848), 3IPK (386–874), 3IOX (386–874). В этой базе данных также имеется модель, полученная при помощи программы AlphaFold, которая на сегодняшний день является «золотым стандартом» в определении пространственной структуры белка по его аминокислотной последовательности. *In silico* эксперимент CASP14 показал, что по точности моделирования результаты программы AlphaFold сопоставимы с результатами, полученными инструментальными методами, и в большинстве случаев эта программа превосходит другие [26]. Большая часть адгезина AgI/II *S. Mutans*, согласно программе AlphaFold, имеет высокую степень достоверности пространственной структуры (рис. 2).

Фрагменты с низкой степенью достоверности пространственной структуры можно отнести к категории внутренне неупорядоченных фрагментов (IDPRs), которые находятся на N- и C-концах белка. В адгезине AgI/II фрагментами с очень низкой степенью достоверности строения являются Met1-Val86, Glu879-Thr890, Pro1496-Asp1565. Выделяют и несколько фрагментов с низкой степенью достоверности: His87-Glu90, Gly119-Ala127, Ala337-Ala385, Arg873-Ala878, Glu891-Pro1001, Glu1494-Asp1495. Несмотря на то что AlphaFold является на сегодняшний день «золотым стандартом» в определении пространственной структуры белков, ориентироваться на структуру адгезина AgI/II, определенную данной программой, следует с осторожностью, так как 1,7 % аминокислотных остатков на карте Рамачандрана, согласно программе PROCHECK, находятся вне зоны допустимых значений двугранных углов (рис. 3). Согласно программе VERIFY 3D, лишь 71,34 % 3D-структуры белка сопоставимо с его аминокислотной последовательностью (рис. 3).

Применение оригинального алгоритма PentUnFOLD в режиме 1D, который так же, как и алгоритм AlphaFold, работает с аминокислотными последовательностями белков, показало, что адгезин AgI/II состоит из 166 аминокислотных остатков (10,61 % белка), входящих в состав структурно неупорядоченных фрагментов: Ala38-Thr41, Thr44-Asp46, Val52-Thr54, Ser71-Ala74, Asn117-Val121, Lys140-Ile145, Thr148-Thr149, Lys153-Asp155, Asn170-Ala172, Tyr177-Asp180, Ala183-Lys185, Ser198-Thr200, Asn260-Ala261, Ala269-Ile273, Asn342-Ala343, Glu351-Thr353, Val380-Lys382, Glu433-Thr435, Glu479-Gln480, Asn495-Asp497, Thr521-Asp523, Lys538-Ser541, Ser563-Asp565, Asn588-Asn589, Thr608-Tyr609, Val626-Thr630, Gln662-Val663, Tyr678-His679, Glu682-Lys683, Ser760-Asp762, Asp805-Lys810, Glu833-Lys834, Thr848-Tyr849, Lys1022-Gln1023, Asp1040-Thr1042, Asp1070-Tyr1073, Val1108-Val1111, Arg1138-Val1139, Glu1165-Asn1166, Ile1170-Lys1173, Asp1195-Asp1200, Asn1232-Ser1238, Pro1249-Ile1252, Lys1298-Gln1300, Asn1310-Gln1311, Thr1396-Gln1398, Thr1432-Ile1436, Gly1468-Thr1469, Gly1480-Asn1486, Arg1509-Thr1510.

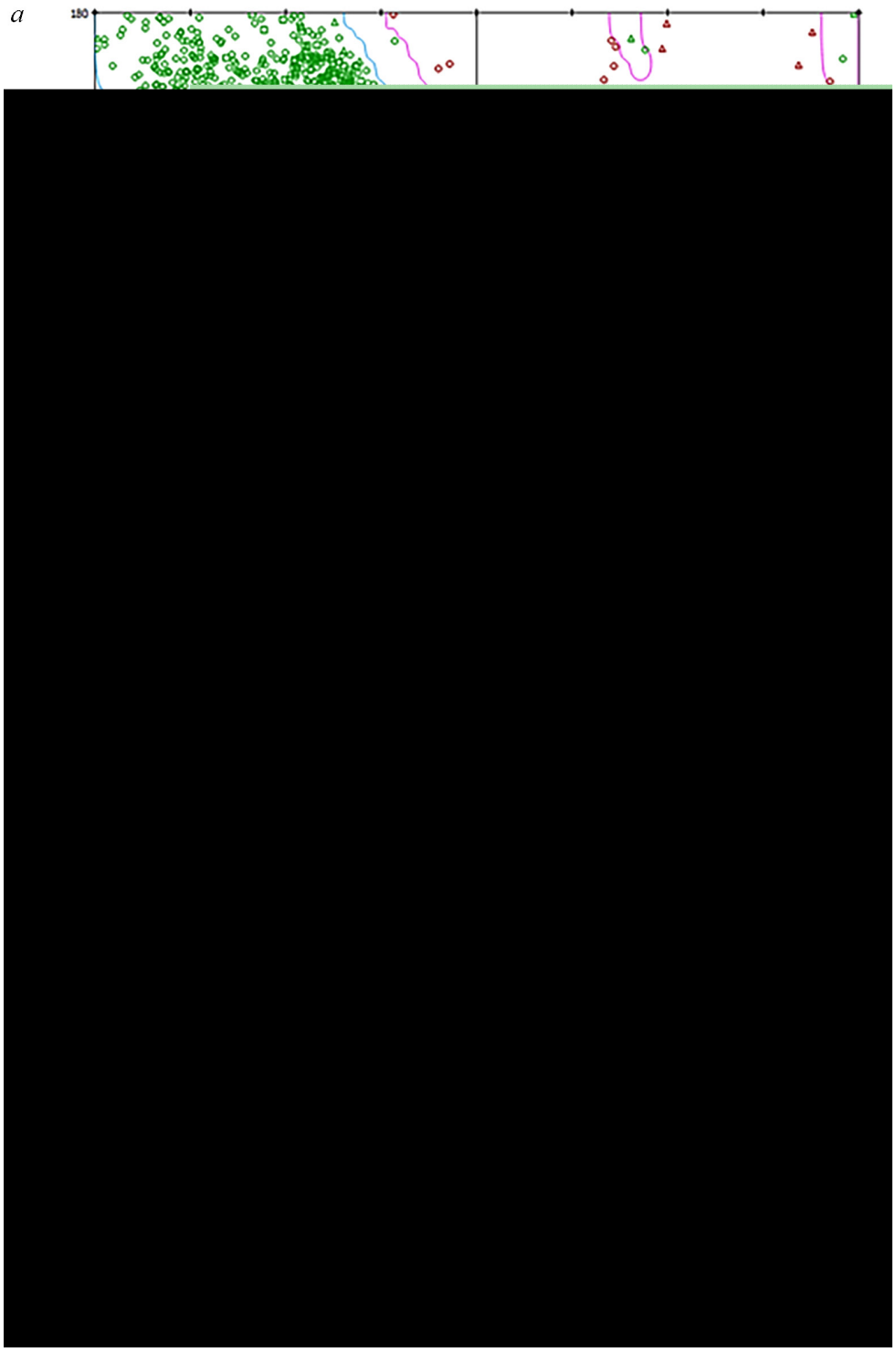


Рис. 3. Карта Рамачандрана (*a*) и сопоставимость 3D-структуры адгезина AgI/II *S. mutans*, полученной с помощью программы AlphaFold, с его аминокислотной последовательностью (*b*)

Fig. 3. Ramachandran plot (*a*) and compatibility of 3D structure of *S. mutans* AgI/II adhesin obtained by AlphaFold program with its amino acid sequence (*b*)

Определение стабильности структуры белка является обязательным условием при отборе фрагмента белка, который может выступать в качестве антигена при разработке любой синтетической вакцины, в том числе и против кариеса зубов. Вторичная структура вакцинного пептида должна соответствовать вторичной структуре данного фрагмента в полноразмерном белке, т. е. в составе вакцинного пептида должны отсутствовать внутренне неупорядоченные фрагменты,

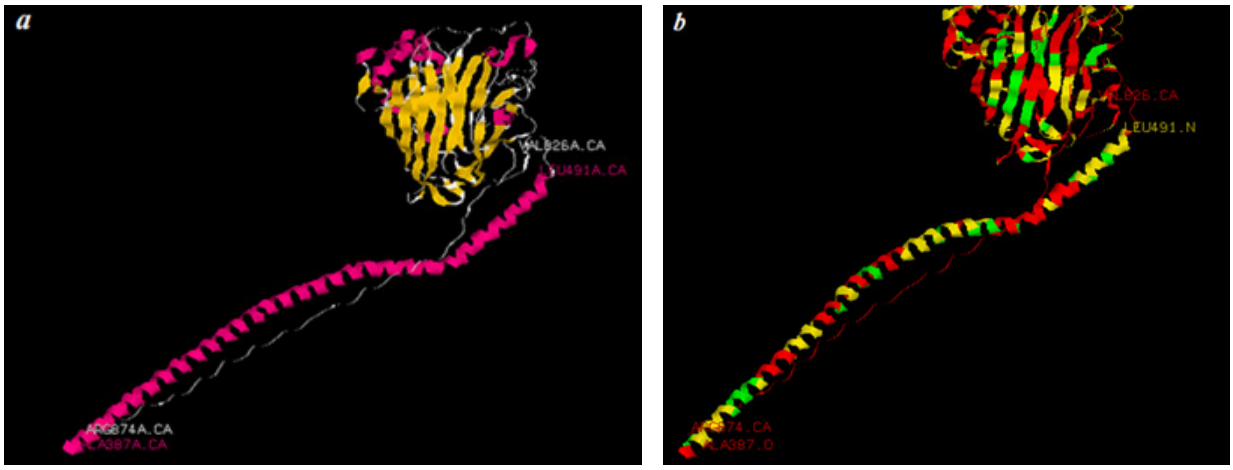


Рис. 4. Структура фрагмента адгезина AgI/II *S. mutans* (PDB ID: 3IOX): *a* – пространственная с аминокислотной последовательностью Ala386–Arg874 (розовым цветом обозначены альфа-спирали, желтым – бета-структура, белым – петли), *b* – стабильная вторичная, определенная программой PentaFOLD (красным цветом обозначены нестабильные элементы вторичной структуры, желтым – метастабильные, зеленым – стабильные)

Fig. 4. Structure of the AgI/II *S. mutans* adhesin fragment (PDB ID: 3IOX): *a* – secondary and tertiary with the amino acid sequence Ala386–Arg874 (alpha helices are indicated in pink, beta structure – in yellow, loops – in white), *b* – stable secondary structure, determined by the PentaFOLD program (unstable elements of the secondary structure are indicated in red, metastable – in yellow, stable – in green)

определенные программами AlphaFold и PentUnFOLD, и нестабильные фрагменты вторичной структуры, определенные программой PentaFOLD. В противном случае антитела, выработанные к вакцинному пептиду, не будут распознавать белок патогенных микроорганизмов. Поэтому для оценки воспроизведения вторичной и третичной структуры в вакцинном пептиде нами будет использоваться структура поверхностного адгезина *S. mutans* с PDB ID: 3IOX, так как она содержит информацию об областях, богатых не только аланином, но и пролином (рис. 4). Что касается данной структуры, как и структуры полноразмерного белка, полученной программой AlphaFold, следует обратить внимание на уникальное пространственное расположение разных фрагментов белка: вдоль альфа-спиралей из области, богатой аланином, следуют петли из области, богатой пролином. На рис. 4 обозначена граница альфа-спирали (согласно программе DSSP) Ala387-Leu491, рядом с которой следует петля Val826-Arg874. Согласно же алгоритму PentaFOLD, область, богатая пролином, определяется как нестабильная. Стабильными же являются лишь аминокислотные остатки Glu389, Ala398-Ala404, Val406, Ala427-Asn428, Asn435-Ile438, Leu453-Ala454, Leu460-Ala461, Tyr463, Ala468, Glu480, Thr482, Ala486-Ala487 из области, богатой аланином (рис. 4).

На наш взгляд, для молекулярного дизайна вакцинного пептида необходимо использовать отличающиеся стабильностью фрагменты данной пространственной структуры адгезина AgI/II *S. mutans*, которые также должны формировать уникальные пространственные B-клеточные эпитопы. При этом качество модели, приведенной на рис. 4, не вызывает сомнений, так как получена она не с помощью предсказательного алгоритма AlphaFold, а в результате рентгеноструктурного анализа кристалла белка. Качество модели подтверждается также алгоритмами VERIFY 3D и PROCHECH (рис. 5).

Действительно, на карте Рамачандрана в запрещенных областях нет аминокислотных остатков, а в дополнительной разрешенной области их всего лишь 0,5 %. Согласно же программе VERIFY 3D, 96,93 % фрагментов этой модели сопоставимо с аминокислотной последовательностью данного фрагмента белка.

Следует подчеркнуть, что на наиболее стабильный фрагмент поверхностного адгезина *S. mutans* будут вырабатываться антитела и против соответствующего белка *S. sobrinus*, поскольку поверхностные белки *S. mutans* и *S. sobrinus* на 67,5 % идентичны по аминокислотной последовательности и на 84,8 % гомологичны согласно программе SSEARCH (рис. 6).

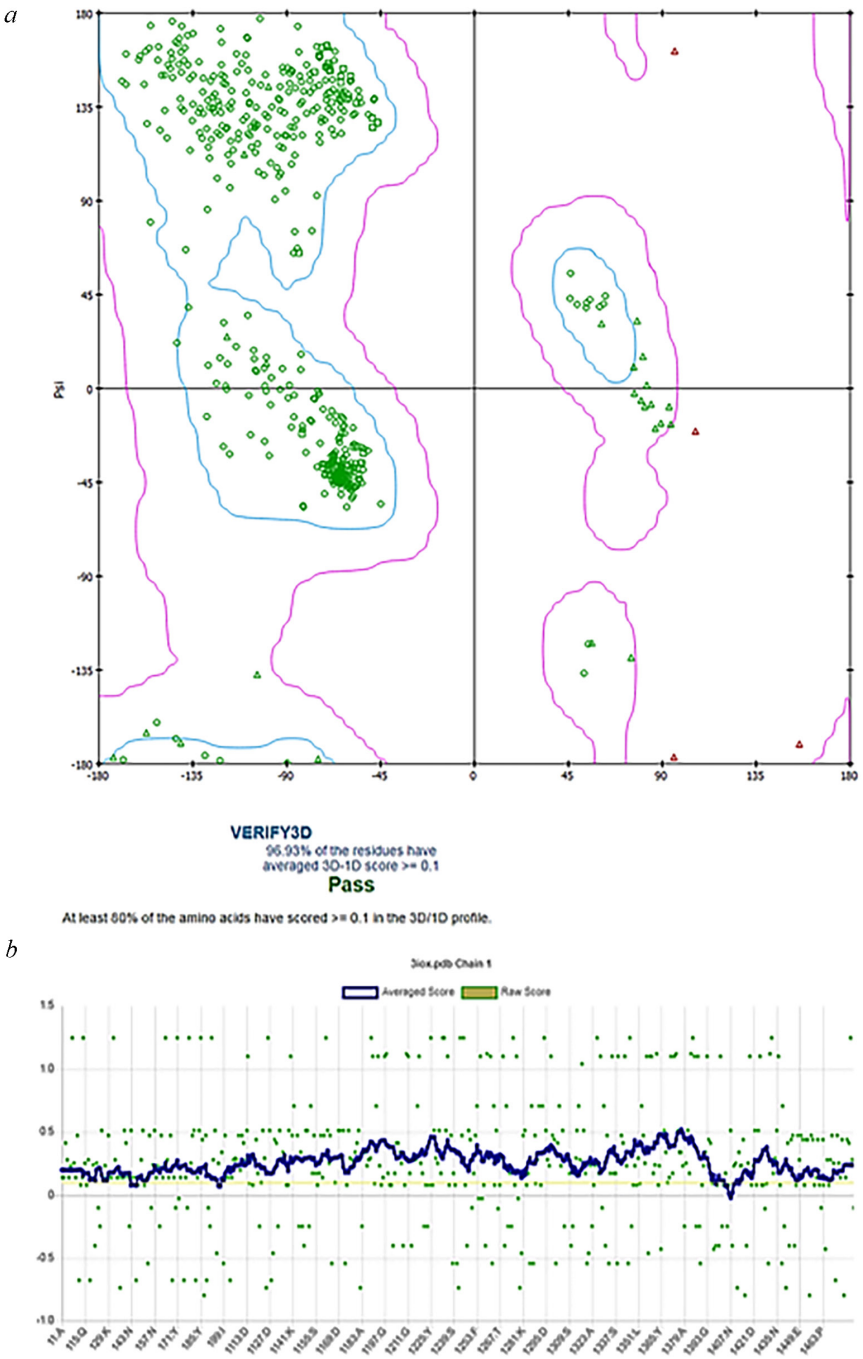


Рис. 5. Карта Рамачандрана (*a*) и сопоставимость 3D-структуры фрагмента адгезина AgI/II *S. mutans* (PDB ID: 3IOX) с его аминокислотной последовательностью (*b*)

Fig. 5. Ramachandran plot (*a*) and comparability of 3D structure of *S. mutans* AgI/II adhesin fragment (PDB ID: 3IOX) with its amino acid sequence (*b*)

Заключение. Для создания эффективной и безопасной вакцины от кариеса зубов мы предлагаем провести классический эксперимент, начинающийся *in silico* и заканчивающийся *in vitro*, который ранее был успешно применен для установления строения подмембранного домена гемагглютинина вируса гриппа A/H1N1 [34, 35]. Опубликованных данных о стабильности вторичной структуры главного поверхностного адгезина *S. mutans* и *S. sobrinus* до сих пор нет. Тем не менее многочисленные эксперименты на лабораторных животных так и не привели к созданию готового продукта. В данном исследовании предлагается применить обширный ряд биоинформатических методик, в том числе оригинальных, и на основании полученных результатов

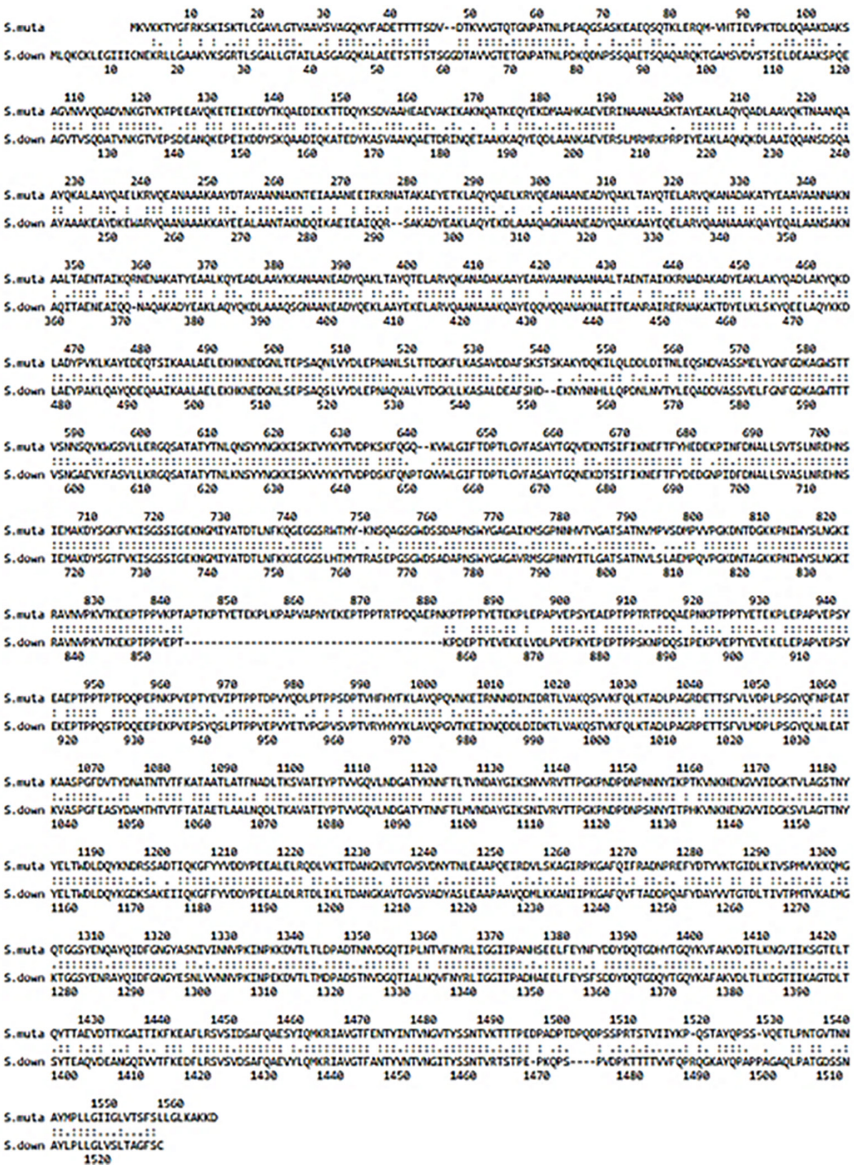


Рис. 6. Гомологичность аминокислотных последовательностей адгезина AgI/II *S. mutans* и SpaA *S. sobrinus* (*S. downei*)

Fig. 6. Homology of amino acid sequences of the AgI/II protein of *S. mutans* and SpaA *S. sobrinus* (*S. downei*)

отобрать наиболее стабильные антигены. Одним из таких алгоритмов является PentUnFOLD, который не только является принципиально новым, но и превосходит имеющиеся аналоги [30]. В качестве антигена планируется использовать короткие (наиболее стабильные и иммуногенные) фрагменты из богатых аланином и пролином областей главного поверхностного адгезина *S. mutans* и/или *S. sobrinus*, которые могут взаимодействовать между собой, формируя при этом уникальный пространственный эпитоп.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Стоматология: сб. клин. протоколов: в 2 ч. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь; под общ. ред. С. П. Рубниковича. – Минск: БГМУ, 2023. – Ч. 1. – 468 с.

2. A nanoparticle-based anticaries vaccine enhances the persistent immune response to inhibit streptococcus *mutans* and prevent caries / Y.-B. Yu [et al.] // Microbiol. Spectr. – 2023. – Vol. 11, N 2. – P. e0432822. https://doi.org/10.1128/spectrum.04328-22

3. Human oral microbiota and its modulation for oral health / Y. Zhang [et al.] // Biomed. Pharmacother. – 2018. – Vol. 99. – P. 883–893. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146

4. Smith, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns / D. J. Smith // Crit. Rev. Oral Biol. Med. – 2002. – Vol. 13, N 4. – P. 335–349. https://doi.org/10.1177/154411130201300404

5. Patel, M. Dental caries vaccine: are we there yet? / M. Patel // Lett. Appl. Microbiol. – 2020. – Vol. 70, N 1. – P. 2–12. https://doi.org/10.1111/lam.13218

6. Forssten, S. D. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models / S. D. Forssten, M. Björklund, A. C. Ouwehand // Nutrients. – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. 290–298. https://doi.org/10.3390/nu2030290

7. Zhang, J. S. Oral microbiome and dental caries development / J. S. Zhang, C. H. Chu, O. Y. Yu // Dent. J. (Basel). – 2022. – Vol. 10, N 10. – Art. 184. https://doi.org/10.3390/dj10100184

8. Talbman, M. A. Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats / M. A. Talbman, D. J. Smith // Infect. Immun. – 1974. – Vol. 9, N 6. – P. 1079–1091. https://doi.org/10.1128/iai.9.6.1079-1091.1974

9. Effective immunity to dental caries: protection of gnotobiotic rats by local immunization with *Streptococcus mutans* / J. R. McGhee [et al.] // J. Immunol. – 1995. – Vol. 114, N 1, pt. 2. – P. 300–305. https://doi.org/10.4049/jimmunol.114.1_part_2.300

10. Russell, R. R. Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans* / R. R. Russell // J. Gen. Microbiol. – 1979. – Vol. 114, N 1. – P. 109–115. https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-109

11. Purification and characterization of a saliva-interacting cell wall protein from *Streptococcus mutans* serotype f by using monoclonal antibody immunoaffinity chromatography / F. Ackermans [et al.] // Biochem. J. – 1985. – Vol. 228, N 1. – P. 211–217. https://doi.org/10.1042/bj2280211

12. Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue / M. Hughes [et al.] // Infect. Immun. – 1980. – Vol. 27, N 2. – P. 576–588. https://doi.org/10.1128/iai.27.2.576-588.1980

13. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin / D. R. Demuth [et al.] // Microb. Pathog. – 1990. – Vol. 9, N 3. – P. 199–211. https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90022-i

14. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model / P. J. Crowley [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67, N 3. – P. 1201–1206. https://doi.org/10.1128/iai.67.3.1201-1206.1999

15. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys / T. Lehner [et al.] // Infect. Immun. – 1981. – Vol. 34, N 2. – P. 407–415. https://doi.org/10.1128/iai.34.2.407-415.1981

16. Redman, T. K. Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*: effects of the *Salmonella* virulence plasmid on the induction of protective and sustained humoral responses in rats / T. K. Redman, C. C. Harmon, S. M. Michalek // Vaccine. – 1996. – Vol. 14, N 9. – P. 868–878. https://doi.org/10.1016/0264-410x(96)00013-8

17. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen / I. Takahashi [et al.] // J. Immunol. – 1991. – Vol. 146, N 1. – P. 332–336. https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.1.332

18. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins / L. J. Brady [et al.] // Mol. Microbiol. – 2010. – Vol. 77, N 2. – P. 276–286. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07212.x

19. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen / M. Nakai [et al.] // Infect. Immun. – 1993. – Vol. 61, N 10. – P. 4344–4349. https://doi.org/10.1128/iai.61.10.4344-4349.1993

20. Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus* / R. J. LaPolla [et al.] // Infect. Immun. – 1991. – Vol. 59, N 8. – P. 2677–2685. https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2677-2685.1991

21. Dental caries vaccine availability: Challenges for the 21st century / A. S. M. Giasuddin [et al.] // J. Immunol. Immunother. – 2017. – Vol. 1, N 7. – Art. 100002.

22. Immunochemistry of the *Streptococcus mutans* BHT cell membrane: Detection of determinants cross-reactive with human heart tissue / G. Y. Ayakawa [et al.] // Infect. Immun. – 1985. – Vol. 48, N 2. – P. 280–286. https://doi.org/10.1128/iai.48.2.280-286.1985

23. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia / K. Nakano [et al.] // Microb. Infect. – 2006. – Vol. 8, N 1. – P. 114–121. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.005

24. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1 / M. T. Batista [et al.] // Vaccine. – 2017. – Vol. 35, N 52. – P. 7273–7282. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.007

25. UniProt: the Universal Protein knowledgebase / R. Apweiler [et al.] // Nucl. Acids Res. – 2004. – Vol. 32. – P. D115–D119. https://doi.org/10.1093/nar/gkh131

26. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 596, N 7873. – P. 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

27. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / V. V. Poboinev [et al.] // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54, N 8. – P. 1155–1171. https://doi.org/10.1007/s00726-022-03153-5

28. Khrustalev, V. V. The PentaFOLD 3.0 algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides / V. V. Khrustalev // Protein Pept. Lett. – 2021. – Vol. 28, N 5. – P. 573–588. https://doi.org/10.2174/0929866527666201110123851

29. Smith, T. F. Identification of common molecular subsequences / T. F. Smith, M. S. Waterman // J. Mol. Biol. – 1981. – Vol. 147, N 1. – P. 195–197. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5

30. Eisenberg, D. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles / D. Eisenberg, R. Lüthy, J. U. Bowie // Methods Enzymol. – 1997. – Vol. 277. – P. 396–404. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)77022-8

31. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures / R. A. Laskowski [et al.] // J. App. Cryst. – 1993. – Vol. 26. – P. 283–291. https://doi.org/10.1107/s0021889892009944

32. An intramolecular lock facilitates folding and stabilizes the tertiary structure of *Streptococcus mutans* adhesin P1 / K. P. Heim [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2014. – Vol. 111, N 44. – P. 15746–15751. https://doi.org/10.1073/pnas.1413018111

33. Engineering protein stability with atomic precision in a monomeric miniprotein / E. G. Baker [et al.] // Nat. Chem. Biol. – 2017. – Vol. 13, N 7. – P. 764–770. https://doi.org/10.1038/nchembio.2380

34. The cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin is β-structural / V. V. Khrustalev [et al.] // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2022. – Vol. 40, N 10. – P. 4642–4661. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1860827

35. Peptide models of the cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin expand understanding its pH-dependent modes of interaction with matrix protein M1 / V. V. Poboinev [et al.] // Protein J. – 2023. – Vol. 42, N 4. – P. 288–304. https://doi.org/10.1007/s10930-023-10101-z

References

1. Rubnikovich S. P. (ed.). *Dentistry: collection of clinical protocols. Pt. 1.* Minsk, Belarusian State Medical University, 2023. 468 p. (in Russian).

2. Yu Y. B., Liu Y., Liang H., Dong X., Yang X. Y., Li S., Guo Z. A nanoparticle-based anticaries vaccine enhances the persistent immune response to inhibit streptococcus *mutans* and prevent caries. *Microbiology Spectrum*, 2023, vol. 11, no. 2, p. e0432822. https://doi.org/10.1128/spectrum.04328-22

3. Zhang Y., Wang X., Li H., Ni C., Du Z., Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, vol. 99, pp. 883–893. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146

4. Smith D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 2002, vol. 13, no. 4, pp. 335–349. https://doi.org/10.1177/154411130201300404

5. Patel M. Dental caries vaccine: are we there yet? *Letters in Applied Microbiology*, 2020, vol. 70, no. 1, pp. 2–12. https://doi.org/10.1111/lam.13218

6. Forssten S. D., Björklund M., Ouwehand A. C. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*, 2010, vol. 2, no. 3, pp. 290–298. https://doi.org/10.3390/nu2030290

7. Zhang J. S., Chu C. H., Yu O. Y. Oral microbiome and dental caries development. *Dentistry Journal (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 10, art. 184. https://doi.org/10.3390/dj10100184

8. Talbman M. A., Smith D. J. Effects of local immunization with *Streptococcus mutans* on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats. *Infection and Immunity*, 1974, vol. 9, no. 6, pp. 1079–1091. https://doi.org/10.1128/iai.9.6.1079-1091.1974

9. McGhee J. R., Michalek S. M., Webb J., Navia J. M., Rahman A. F., Legler D. W. Effective immunity to dental caries: protection of gnotobiotic rats by local immunization with *Streptococcus mutans*. *Journal of Immunology*, 1975, vol. 114, no. 1, pt. 2, pp. 300–305. https://doi.org/10.4049/jimmunol.114.1_part_2.300

10. Russell R. R. Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology*, 1979, vol. 114, no. 1, pp. 109–115. https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-109

11. Ackermans F., Klein J. P., Ogier J., Bazin H., Cormont F., Frank R. M. Purification and characterization of a saliva-interacting cell wall protein from *Streptococcus mutans* serotype f by using monoclonal antibody immunoaffinity chromatography. *Biochemical Journal*, 1985, vol. 228, no. 1, pp. 211–217. https://doi.org/10.1042/bj2280211

12. Hughes M, Machardy S. M., Sheppard A. J., Woods N. C. Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. *Infection and Immunity*, 1980, vol. 27, no. 2, pp. 576–588. https://doi.org/10.1128/iai.27.2.576-588.1980

13. Demuth D. R., Lammey M. S., Huck M., Lally E. T., Malamud D. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. *Microbial Pathogenesis*, 1990, vol. 9, no. 3, pp. 199–211. https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90022-i

14. Crowley P. J., Brady L. J., Michalek S. M., Bleweis A. S. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. *Infection and Immunity*, 1999, vol. 67, no. 3, pp. 1201–1206. https://doi.org/10.1128/iai.67.3.1201-1206.1999

15. Lehner T., Russell M. W., Caldwell J., Smith R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Infection and Immunity*, 1981, vol. 34, no. 2, pp. 407–415. https://doi.org/10.1128/iai.34.2.407-415.1981

16. Redman T. K., Harmon C. C., Michalek S. M. Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*: effects of the *Salmonella* virulence plasmid on the induction of protective and sustained humoral responses in rats. *Vaccine*, 1996, vol. 14, no. 9, pp. 868–878. https://doi.org/10.1016/0264-410x(96)00013-8

17. Takahashi I., Okahashi N., Matsushita K., Tokuda M., Kanamoto T., Munekata E., Russell M. W., Koga T. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. *Journal of Immunology*, 1991, vol. 146, no. 1, pp. 332–336. https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.1.332

18. Brady L. J., Maddocks S. E., Larson M. R. Forsgren N., Persson K., Deivanayagam C. C., Jenkinson H. F. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Molecular Microbiology*, 2010, vol. 77, no. 2, pp. 276–286. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07212.x

19. Nakai M., Okahashi N., Ohta H., Koga T. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infection and Immunity*, 1993, vol. 61, no. 10, pp. 4344–4349. https://doi.org/10.1128/iai.61.10.4344-4349.1993

20. LaPolla R. J., Haron J. A., Kelly C. G., Taylor W. R., Bohart C., Hendricks M., Pyati J. P., Graff R. T., Ma J. K., Lehner T. Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*. *Infection and Immunity*, 1991, vol. 59, no. 8, pp. 2677–2685. https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2677-2685.1991

21. Giasuddin A. S. M., Huda S., Jhuma K. A., Haq A. M. Dental caries vaccine availability: Challenges for the 21st century. *Journal of Immunology and Immunotherapy*, 2017, vol. 1, no. 7, art. 100002.

22. Ayakawa G. Y., Siegel J. L., Crowley P. J., Bleiweis A. S. Immunochemistry of the *Streptococcus mutans* BHT cell membrane: detection of determinants cross-reactive with human heart tissue. *Infection and Immunity*, 1985, vol. 48, no. 2, pp. 280–286. https://doi.org/10.1128/iai.48.2.280-286.1985

23. Nakano K., Tsuji M., Nishimura K., Nomura R., Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes and Infection*, 2006, vol. 8, no. 1, pp. 114–121. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.06.005

24. Batista M. T., Ferreira E. L., Pereira G. S., Stafford P., Maeda D. L. N. F., Rodrigues J. F., Brady L. J., Johnston S. A., Ferreira L. C. S., Ferreira R. C. C. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1. *Vaccine*, 2017, vol. 35, no. 52, pp. 7273–7282. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.007

25. Apweiler R., Bairoch A., Wu C. H., Barker W. C., Boeckmann B., Ferro S. [et al.]. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, pp. D115–D119. https://doi.org/10.1093/nar/gkh131

26. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O. [et al.]. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, vol. 596, no. 7873, pp. 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

27. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Kasko T. E., Popkov V. D. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins. *Amino Acids*, 2022, vol. 54, no. 8, pp. 1155–1171. https://doi.org/10.1007/s00726-022-03153-5

28. Khrustalev V. V. The PentaFOLD 3.0 algorithm for the selection of stable elements of secondary structure to be included in vaccine peptides. *Protein and Peptide Letters*, 2021, vol. 28, no. 5, pp. 573–588. https://doi.org/10.2174/0929866527666201110123851

29. Smith T. F., Waterman M. S. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 1981, vol. 147, no. 1, pp. 195–197. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5

30. Eisenberg D., Lüthy R., Bowie J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, 1997, vol. 277, pp. 396–404. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)77022-8

31. 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*, 1993, vol. 26, pp. 283–291. https://doi.org/10.1107/s0021889892009944

32. Heim K. P., Crowley P. J., Long J. R., Kailasan S., McKenna R., Brady L. J. An intramolecular lock facilitates folding and stabilizes the tertiary structure of *Streptococcus mutans* adhesin P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, vol. 111, no. 44, pp. 15746–15751. https://doi.org/10.1073/pnas.1413018111

33. Baker E. G., Williams C., Hudson K. L., Bartlett G. J., Heal J. W., Porter Goff K. L., Sessions R. B., Crump M. P., Woolfson D. N. Engineering protein stability with atomic precision in a monomeric miniprotein. *Nature Chemical Biology*, 2017, vol. 13, no. 7, pp. 764–770. https://doi.org/10.1038/nchembio.2380

34. Khrustalev V. V., Kordyukova L. V., Arutyunyan A. M., Poboinev V. V., Khrustaleva T. A., Stojarov A. N., Baratova L. A., Sapon A. S., Lugin V. G. The cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin is β-structural. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2022, vol. 40, no. 10, pp. 4642–4661. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1860827

35. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Akunevich A. A., Shalygo N. V., Stojarov A. N., Khrustaleva T. A., Kordyukova L. V. Peptide models of the cytoplasmic tail of influenza A/H1N1 virus hemagglutinin expand understanding its pH-dependent modes of interaction with matrix protein M1. *Protein Journal*, 2023, vol. 42, no. 4, pp. 288–304. https://doi.org/10.1007/s10930-023-10101-z

Информация об авторах

Рубникович Сергей Петрович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, ректор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rubnikovich@mail.ru

Побойнев Виктор Витольдович – ст. преподаватель. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dremozzew@mail.ru

Хрусталёв Владислав Викторович – д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

Information about the authors

Sergey P. Rubnikovich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rubnikovich@mail.ru

Victor V. Poboinev – Senior Lecturer. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dremozzew@mail.ru

Vladislav V. Khrustalev – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru