

Estudos estruturais de hidrolases glicosídicas produzidas pela bactéria probiótica *Bifidobacterium longum*

Projeto de iniciação científica - PIBIC

Orientadora: Priscila Oliveira de Giuseppe

Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

Campinas, 2019

INTRODUÇÃO

As bactérias que habitam o intestino humano coevoluíram com seus hospedeiros e formam microbiotas com trilhões de células bacterianas [1]. As bactérias do gênero *Bifidobacterium* estão entre os primeiros organismos a habitarem esse microambiente, correspondendo a cerca de 70% das bactérias do intestino de um recém-nascido, e exercem efeitos benéficos à saúde humana, como a modulação do sistema imune e proteção contra doenças infecciosas [2]. Na idade adulta, a administração de bifidobactérias é indicada para o tratamento de desordens como a Doença Inflamatória Intestinal (Doença de Crohn), diarreia, colite entre outros [3][4], e por isso são consideradas probióticas [5].

A maioria das espécies de *Bifidobacterium* habita os cólons transversos e descendentes do intestino grosso de seus hospedeiros, onde a disponibilidade de nutrientes é baixa. Por isso, desenvolveram CAZymes (do inglês, *carbohydrate active enzyme*, www.cazy.com) para a hidrólise e captação de um amplo espectro de carboidratos indigestíveis vindos da alimentação e do próprio hospedeiro [6]. Assim, além de uma importância biomédica, as enzimas de bifidobactérias oferecem um grande potencial biotecnológico pela capacidade de degradar carboidratos recalcitrantes.

As bifidobactérias produzem hidrolases glicosídicas que atuam sinergisticamente para a completa degradação de carboidratos complexos. Para um melhor entendimento desses sistemas ao nível molecular, a elucidação da estrutura tridimensional das enzimas que o compõem é essencial. Assim, este projeto visa a realização de ensaios de

cristalização de três hidrolases glicosídicas presentes em sistemas de degradação de carboidratos de *Bifidobacterium longum*. Os resultados obtidos auxiliarão a compreender a interface molecular da relação bactéria-hospedeiro, além de gerar dados que contribuirão para se avaliar o potencial biotecnológico e biomédico das enzimas estudadas.

ESTADO DA ARTE

O estudo estrutural de hidrolases glicosídicas de *Bifidobacterium* tem mostrado, ao nível atômico, as estratégias empregadas para a desconstrução de oligossacarídeos do leite [7][8], galacto-oligossacarídeos [9], O-glicanos [10] e carboidratos derivados de plantas [11][12]. Estudos de nosso grupo de pesquisa elucidaram o papel biológico de uma β -manosidase produzida por *Bifidobacterium longum* presente na cascata de degradação de N-glicanos, carboidratos produzidos pelas células do tecido epitelial do hospedeiro [13]. Tal enzima apresenta elementos estruturais nunca antes descritos que permitem uma alta especificidade com seu substrato, incluindo uma região que se fecha sobre o sítio ativo como uma tampa; e um resíduo de triptofano essencial tanto para a estabilização da estrutura quaternária quanto para o reconhecimento do substrato [14]. Isso demonstra que a busca por novas estratégias de captação de carboidratos em microbiotas pode revelar mecanismos moleculares inéditos.

OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo a purificação e cristalização de três hidrolases glicosídicas de *Bifidobacterium longum*. Os objetivos específicos consistem em:

- 1) Expressar as enzimas recombinantes em cepas de *Escherichia coli*;
- 2) Purificar as proteínas solúveis em diferentes etapas de cromatografia líquida;
- 3) Realizar análises de homogeneidade estrutural através de ensaios de espalhamento de luz (DLS);
- 4) Testar a estabilidade das enzimas em diferentes tampões, pHs e força iônica por fluorimetria de varredura diferencial (DSF);
- 5) Realizar ensaios de cristalização das amostras.

METODOLOGIA

- **Expressão heteróloga de proteínas**

O vetor de expressão pET28a contendo a sequência codificante para cada uma das proteínas será transformado em cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Uma colônia isolada será inoculada em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Essa cultura será adicionada a 500 mL de meio TB e será incubada a 37 °C até que a densidade óptica a 600 nm atinja 0,6. A expressão será induzida com 0,5 mM de isopropil-X-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e a incubação será continuada por 16 horas a 20 °C. Para obtenção das proteínas na forma solúvel, as células serão coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão apropriado e lisadas por sonicação. A expressão das proteínas será avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) [15].

- **Purificação das proteínas recombinantes**

As proteínas expressas serão purificadas via cromatografia de afinidade à tag 6xHis em coluna HiTrap® Chelating HP (GE Healthcare), acoplada ao sistema AKTA-FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography – Amersham Biosciences). A purificação será monitorada no comprimento de onda 280 nm e as amostras serão verificadas através de SDS-PAGE 13 %. De acordo com o grau de pureza das amostras resultantes, outras etapas de cromatografia podem ser realizadas, como a de troca iônica. Para garantir a homogeneidade estrutural das amostras, será realizada a cromatografia de exclusão molecular como última etapa de purificação. A concentração das proteínas purificadas será determinada pela medida da absorção da amostra em 280 nm [16], onde o coeficiente de absorvidade molar ϵ será obtido através da ferramenta ProtParam no site ExPASy (<http://us.expasy.org/>).

- **Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

A técnica de DLS permite estimar a distribuição de tamanho das populações de partículas que estão presentes na solução, identificando diferentes estados de oligomerização da mesma proteína ou a formação de agregados proteicos. Experimentos de DLS serão realizados para averiguar a monodispersidade populacional em solução (homogeneidade estrutural) das enzimas, parâmetro essencial ao sucesso dos ensaios de

cristalização [17]. Serão selecionadas as amostras mais monodispersas para as etapas seguintes. Os dados serão obtidos em equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK) e os dados tratados com o *software* do próprio equipamento.

- **Fluorimetria de Varredura Diferencial (DSF)**

A temperatura de desenovelamento (T_m , do inglês *temperature of melting*) das proteínas será avaliada em condições variando o tampão utilizado, o pH, a força iônica, entre outros parâmetros para se identificar a condição mais estável para os ensaios de cristalização. Serão adicionados 2 μM de proteína, Sypro Orange (Thermo Fisher) na proporção de 1:1000 e tampão em volume para completar 25 μl de reação. Os experimentos serão feitos em triplicata. Em equipamento ViiA7 real-time (Applied Biosystems), as amostras serão aquecidas de 25 °C a 95 °C em velocidade de 1 °C por minuto. As curvas geradas serão exportadas e analisadas utilizando o programa Origin8. Para cada curva, serão escolhidas apenas as regiões que apresentem formato sigmoidal para o cálculo da T_m , utilizando a função Boltzmann do programa.

- **Ensaio de cristalização**

As enzimas alvo obtidas por expressão e purificação, com grau de pureza e monodispersidade confirmadas por SDS-PAGE e DLS, serão cristalizadas em salas climatizadas com temperatura e umidade reguladas para melhor desempenho na reprodutibilidade dos cristais. Serão feitos ensaios de cristalização com as enzimas isoladas e dos complexos enzima-substrato. Serão testadas inicialmente soluções disponíveis na forma de kits comerciais, com uma combinação de diferentes sais, agentes precipitantes em concentrações variadas e em diferentes pHs. A variação desses parâmetros visa trazer a solução a um estado de supersaturação, por meio da difusão de vapor, favorecendo o aparecimento de cristais. Os kits que serão testados são: Crystal Screen e Crystal Screen 2 (Hampton Research), Wizard Screens I e II (Emerald Biosystems), PACT (Nextal/QUAIGEN), JCSG (Nextal/QUAIGEN), SaltRx (Hampton Research) e Precipitant Synergy (Emerald Biosystems). Os experimentos serão realizados por difusão do vapor tanto em gota pendente como em gota sentada. Nessa técnica, a solução proteica será submetida a diferentes condições experimentais de pH, agente precipitante, força iônica e solventes orgânicos. Cerca de 1 μl da solução de proteína será misturado com 1 μl de solução cristalizadora e equilibrada com a solução do poço. Os

refinamentos das condições de cristalização para obtenção de monocristais adequados a difração de raios X serão feitos pelo método fatorial e técnicas de *micro* e *macro-seeding*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L.V. Hooper, D.R. Littman, A.J. Macpherson. The gut microbiota interactions between the microbiota and the immune system. *Science* (80-) (2012), 10.1126/science.1223490
- [2] S. Arboleya, C. Watkins, C. Stanton, R.P. Ross. Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Front. Microbiol.*, 7 (2016), Article 1204, 10.3389/fmicb.2016.01204
- [3] P.R. Marteau, M. de Vrese, C.J. Cellier, J. Schrezenmeir. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73 (2001), pp. 430s-436s, 10.1093/ajcn/73.2.430s
- [4] J.L. Round, S.K. Mazmanian. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 9 (2009), pp. 313-323, 10.1038/nri2515
- [5] A. O'Callaghan, D. van Sinderen. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front. Microbiol.*, 7 (2016), Article 925, 10.3389/fmicb.2016.00925
- [6] K. Pokusaeva, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* 6(3) (2011), pp. 285-306, 10.1007/s12263-010-0206-6
- [7] C. Yamada, A. Gotoh, M. Sakanaka, M. Hattie, K.A. Stubbs, A. Katayama-Ikegami, J. Hirose, S. Kurihara, T. Arakawa, M. Kitaoka, S. Okuda, T. Katayama, S.Fushinobu. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chem. Biol.*, 24 (2017), pp. 515-524.e5, 10.1016/j.chembiol.2017.03.012
- [8] D.A. Sela, Y. Li, L. Lerno, S. Wu, A.M. Marcobal, J.B. German, X. Chen, C.B.Lebrilla, D.A. Mills. An infant-associated bacterial commensal utilizes breast milk sialyloligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 286 (2011), pp. 11909-11918, 10.1074/jbc.M110.193359
- [9] A.H. Viborg, F. Fredslund, T. Katayama, S.K. Nielsen, B. Svensson, M. Kitaoka, L.Lo Leggio, M. Abou Hachem. A β 1-6/ β 1-3 galactosidase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B1-04 gives insight into sub-specificities of β -galactoside catabolism within *Bifidobacterium*. *Mol. Microbiol.*, 94 (2014), pp. 1024-1040, 10.1111/mmi.12815
- [10] M. Sato, D. Liebschner, Y. Yamada, N. Matsugaki, T. Arakawa, S.S. Wills, M.Hattie, K.A. Stubbs, T. Ito, T. Senda, H. Ashida, S. Fushinobu. The first crystal structure of a family 129 glycoside hydrolase from a probiotic bacterium reveals critical residues and metal cofactors. *J. Biol. Chem.*, 292 (2017), pp. 12126-12138, 10.1074/jbc.M117.777391

[11] A. Bujacz, M. Jedrzejczak-Krzepkowska, S. Bielecki, I. Redzynia, G. Bujacz. Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *FEBS J.*, 278 (2011), pp. 1728-1744, 10.1111/j.1742-4658.2011.08098.x

[12] T. Ito, K. Saikawa, S. Kim, K. Fujita, A. Ishiwata, S. Kaeothip, T. Arakawa, T. Wakagi, G.T. Beckham, Y. Ito, S. Fushinobu. Crystal structure of glycoside hydrolase family 127 β -D-galactosidase from *Bifidobacterium longum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 447 (2014), pp. 32-37, 10.1016/j.bbrc.2014.03.096

[13] D. Park, G. Xu, M. Barboza, I. M. Shah, M. Wong, H. Raybould, D. A. Mills, C. B. Lebrilla. Enterocyte glycosylation is responsive to changes in extracellular conditions: implications for membrane functions. *Glycobiology*. 27 (2017), pp. 847-860, 10.1093/glycob/cwx041.

[14] R. L. Cordeiro, R. A. S. Pirolla, G. F. Persinoti, F. C. Gozzo, P. O. Giuseppe, M. T. Murakami. N-glycan Utilization by *Bifidobacterium* Gut Symbionts Involves a Specialist β -Mannosidase. *Journal of Molecular Biology*. 431 (2019), pp. 732-747, 10.1016/j.jmb.2018.12.017.

[15] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970), 227(5259), 680-5.

[16] H. Edelhoch. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6 (1967), pp. 1948-1954, 10.1021/bi00859a010

[17] M. Zulauf, A. D'arcy. Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 122 (1992), pp. 102-106, 10.1016/0022-0248(92)90232-8