

## Importancia de *BIG16BP* en el transporte/absorción de fructanos en *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*: un estudio *in silico*.

Vázquez-Hernández M. N., Abraham-Juárez M.R., Ozuna C., Díaz-Cervantes E. \*

Universidad de Guanajuato, Centro Interdisciplinario del Noreste (CINUG), Departamento de Alimentos, km 28 Carretera San José Iturbide-Tierra Blanca, 37975, Tierra Blanca, Guanajuato, México.

\* [e.diaz@ugto.mx](mailto:e.diaz@ugto.mx)

### RESUMEN:

Las proteínas asociadas a la súper-familia de proteínas encargadas del transporte transmembranal (ATP-binding cassette) son de gran importancia para la captación y transporte de diferentes sustratos de gran importancia en las rutas metabólicas de diversos microorganismos. Por ello la necesidad de entender los modos de acción y energías de interacción de estas con prebióticos, como los fructanos, para poder plantear posibles blancos biológicos en la ruta metabólica de estos últimos y poder elucidar cuál de ellos puede resultar más benéfico para los probióticos de nuestro organismo. En este trabajo, a partir de métodos computacionales, fue posible elucidar y detallar las interacciones entre tres fructanos representativos (1-cestosa, bifurcosa y neocestosa) y una proteína de membrana, expresada en *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, la *BIG16BP*. Al mismo tiempo se pudo descartar a la carboximetil celulosa, como sustrato competitivo de dicha proteína y finalmente se puede decir que la proteína transmembrana *BIG16BP* puede jugar un rol importante en el transporte y captación de fructanos con enlaces  $\beta$ -(1,2) y  $\beta$ -(2,6), como son la 1-cestosa, la bifurcosa y la neocestosa, siendo esta un primer blanco biológico en el metabolismo de este tipo de polisacáridos..

**Palabras clave:** *BIG16BP*, fructanos, *in-silico*, *Bifidobacterium*, *docking*, CMC.

### ABSTRACT:

Proteins associated with an ATP binding cassette are widely studied, due they are involved in the uptake and the transport of several substrates with a key role in some probiotic metabolism. For this reason, the need of understanding their action mode and their energies interaction with prebiotics, specifically fructans, to guess the metabolic reaction path and the possible biological targets of these carbohydrates and therefore elucidate the better prebiotic for food formulations. In the present work, through the state of the art of the computational and theoretical chemistry, we are elucidating the kind of interactions between three representative fructans (1-ketose, bifurcose, and neokestose) and one trans-membrane protein (*BIG16BP*), expressed in the prebiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. However, it was possible to consider the carboxymethyl cellulose as a not competitive substrate of the selected protein. Finally, considering the obtained results can be said that *BIG16BP* play a key role in the uptake and transport of  $\beta$ -(1,2) and  $\beta$ -(2,6) fructans, being this protein the first biological target in the metabolic reaction path of this kind of prebiotics..

**Keywords:** *BIG16BP*, fructans, *in-silico*, *Bifidobacterium*, *docking*, CMC

**Área:** Alimentos funcionales / Otros

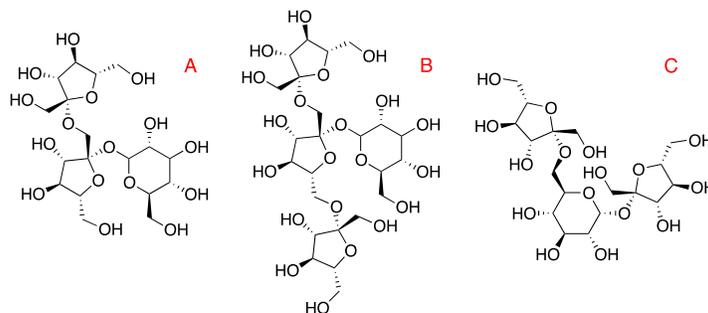
### INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que aportan beneficios a la salud del consumidor (*Ranadheera et al., 2010*), proporcionando un balance a la microflora del intestino, además de diversos beneficios generales y específicos del cuerpo humano. Los géneros de prebióticos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los más ampliamente estudiados por sus efectos benéficos a la salud (*Kailasapathy y Chin, 2000*).

Por otro lado, los prebióticos son oligosacáridos con diferente grado de polimerización, los cuales no son digeribles por el humano, pero fermentables por microorganismos, modulando el crecimiento y actividad de poblaciones microbianas específicas, como los probióticos, las cuales pueden beneficiar las funciones intestinales (*Castro et al., 2016*). Los más usados son: los galactooligosacáridos (GOS) y los fructooligosacáridos (*Ranadheera et al., 2010*). Dentro de éstos últimos destacan los fructanos, que son carbohidratos de reserva de diversas plantas, y están formados por unidades fructofuranosil con enlaces tipo  $\beta$  principalmente.

Las moléculas de fructanos, como 1-cestosa, bifurcosa y neocestosa (Vijn & Smeekens, 1999), ver **Figura 1**, poseen una configuración ramificada a diferencia de la configuración lineal de la inulina comercial (que también

es un fructano, pero derivado de achicoria), lo que les podría otorgar diferentes propiedades y aplicaciones tecnológicas (Ponce *et al.*, 2008). Varios estudios han sido desarrollados, encontrando un efecto favorable de distintos prebióticos sobre bacterias probióticas, como *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* con GOS (Castro *et al.*, 2016). También hay reportes de fructanos, como la inulina, que sugieren que dicho polímero puede ser una buena opción para aumentar beneficios a la salud, aportados por algunas cepas de *Streptococcus spp.* y *Lactobacillus spp.* (Allgeyer *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Principales fructanos encontrados en el agave A) 1-cestosa, B) bifurcosa, C) neocestosa.

No obstante, la caracterización fisicoquímica, estudios y aplicaciones realizados respecto a los fructanos, son muy escasas, pese a sus reconocidos beneficios (Ponce *et al.*, 2008), sabiendo que la fermentación de dichos compuestos promueve la biosíntesis de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, de los cuales, los primeros estimulan el crecimiento de las células de la mucosa colorrectal, retardan la atrofia de la mucosa y disminuyen el riesgo de transformación maligna del colon (Ulloa *et al.*, 2010).

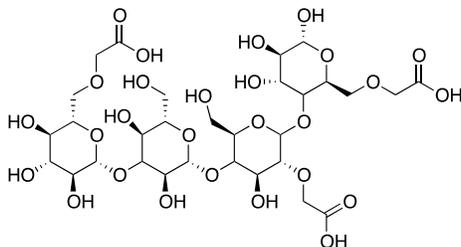
Otra molécula importante para el presente estudio es la carboximetilcelulosa (CMC), producida por modificación química de la celulosa, específicamente introduciendo grupos acetato en su estructura, confiriendo solubilidad de esta en agua (Reyes *et al.*, 2011). Dicha molécula, al presentar una estructura polisacárida similar a los prebióticos seleccionados en este trabajo, puede interferir en la interacción proteína-prebiótico y al ser ampliamente utilizado en la industria de alimentos, por su transparencia, viscosidad y tolerancia a medios ácidos en varios productos, es fácil encontrarla en lácteos congelados, pasteles, pastas, dulces, bebidas de frutas, leches saborizadas, bebidas en polvo, entre otros.

Por otra parte, el estado del arte acerca de las proteínas presentes en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* enuncia que 31 de ellas realizan funciones fisiológicas de membrana, las cuales son importantes desde el punto de vista de las interacciones blanco-ligando, la captación y el transporte de compuestos en las células de dichos microorganismos (Gilad *et al.*, 2011). A su vez, el estudio de interacciones entre polisacáridos y proteínas de esta bacteria, está poco estudiado y no se describe a detalle el tipo de interacción (Janer, *et al.*, 2005), la superficie protéica, ni interacciones con prebióticos de ciertas proteínas de membrana; siendo el estudio de BIG16BP, proteína asociada a la súper-familia de proteínas encargadas del transporte transmembranal (ATP-binding cassette), de los únicos y más recientes que se han realizado, pero cuyo enfoque va a la unión de dicha proteína con oligosacáridos  $\alpha$ -(1-6) (Ejby *et al.*, 2016), no estando reportada la interacción de dicho blanco, presente en la bacteria de interés, con fructanos o compuestos con enlaces  $\beta$ -(1,2) y  $\beta$ -(2,6), que son enlaces presentes en los fructanos.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se plantea evaluar la interacción entre la proteína transmembranal BIG16BP y tres de los fructanos más comunes (1-cestosa, bifurcosa y neocestosa), con la finalidad de evaluar, de manera computacional, cuál de ellos presenta la mejor interacción, así como los modos de unión fructano-BIG16BP, para de esta manera saber que fructano puede introducirse más sencillo a *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, metabolizándose posteriormente, favoreciendo el crecimiento bacteriano y proponiendo dicha proteína como primer blanco biológico de la ruta de captación, transporte y posterior metabolismo de este tipo de azúcares complejas. A su vez, se utilizará como sustrato competitivo la CMC, por estar presente en diversas formulaciones de alimentos, para de esta manera evaluar como pudiera interferir dicho oligosacárido en la captación y transporte de los fructanos estudiados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La carboximetilcelulosa, así como los fructanos seleccionados serán considerados como ligandos de *BIG16BP*, siendo previamente modelados de manera finita (**Figura 1** y **Figura 2**), capeando los extremos del polímero con protones, para evitar valencias libres.



**Figura 2.** Modelo propuesto para la carboximetil celulosa.

Los ligandos modelados serán optimizados a nivel PM6 (Stewart, 2007) y utilizando el formalismo de la teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés), específicamente empleando el funcional meta GGA (PBE), formulado por Perdew, Burke y Ernzerhof (*Perdew, Burke, & Ernzerhof, 1996*), a través del paquete computacional (G09) Gaussian 09 (Frisch et al., 2009), el cual, se reporta en la literatura como un método apropiado para obtener ángulos, distancias de enlace, energías y propiedades electrónicas similares a las experimentales.

Finalmente, uno de los objetivos de este trabajo es elucidar un posible blanco biológico involucrado en la ruta metabólica de los ligandos seleccionados (CMC y fructanos), para lo cual y debido a la amplia gama de proteínas presentes en *B. animalis* subsp. *Lactis*, en este estudio debemos enfocarnos en una proteína en específico, la cuál debe ser caracterizada y corregida a través de los datos cristalográficos obtenidos del estado del arte. La proteína seleccionada será la *BIG16BP* (Ejby et al., 2016), cuyos datos cristalográficos se descargarán de la base de datos *Protein Data Bank* (código PDB: 4ZZE), para poder realizar el modelado molecular correspondiente, a través de metodologías basadas en la fisicoquímica teórica-computacional, empleando los softwares que se mencionarán a continuación.

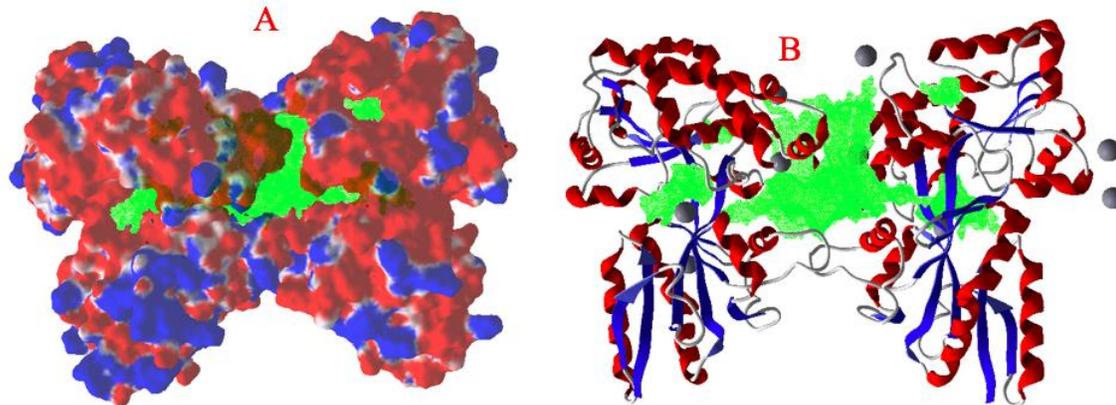
Dicho modelado comenzará con las correcciones de solventes y pH a través del paquete computacional Chimera (*UCSF, 2004*). La interacción entre los prebióticos seleccionados, la carboximetilcelulosa y la *BIG16BP*, se llevará a cabo con el software (MVD) Molegro Virtual Docker (*Thomsen & Christensen, 2006*) a través de la función de scoring MoldockScore (*Yang & Chen, 2004*). Finalmente, el análisis de interacciones no covalentes, entre los ligandos y proteína seleccionada, se llevarán a cabo con el software MVD.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### - Tratamiento previo de la proteína y los ligandos seleccionados

A través de la metodología planteada, se obtuvieron las estructuras de los ligandos seleccionados, optimizadas al nivel PBE/STO-3G, asignándoles sus cargas parciales y siendo sometidas, posteriormente, a acoplamiento molecular *in silico* con la proteína *BIG16BP*. Esta última fue ajustada a pH 7.4, se le eliminaron los solventes, se corrigieron los residuos con errores y se le agregaron cargas parciales a través del paquete computacional Chimera, obteniendo la superficie de potencial electrostático de la **Figura 3**.

El análisis de potencial electrostático de la proteína, demuestra que hay una distribución aleatoria de cargas positivas, negativas y neutras en la superficie proteica, observándose una ligera polarización en la sección media de la superficie, **Figura 3A**, cargándose positivamente hacia la izquierda y negativamente a la derecha. Al mismo tiempo, este blanco biológico, presenta 5 cavidades, dos en cada subunidad y una más grande en el espacio intersticial entre subunidades, **Figura 3B**.



**Figura 3.** A) Superficie de potencial electrostático y B) Estructura secundaria de la proteína *BIG16BP*. En rojo se representan las zonas cargadas negativamente, en azul las positivas y en blanco las neutras. Los cofactores se representan en gris y las cavidades presentes en la superficie de la proteína están coloreadas en verde.

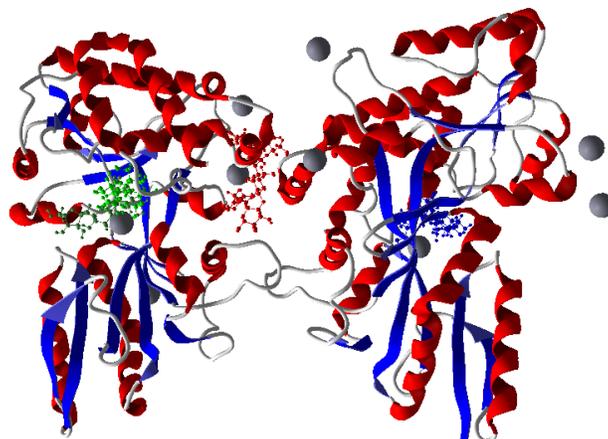
- *Calibración del método*

La calibración del método, consistió principalmente en considerar el ligando co-cristalizado en la proteína *BIG16BP*, como estructuras bio-activas, para posteriormente realizar acoplamientos moleculares *in silico* de dicho ligando con la función de scoring seleccionada. El ligando co-cristalizado en la proteína con código PDB 4ZZE, es un trisacárido de glucosa (3GLC), unido por enlaces  $\alpha$ -(1-6), acoplado en ambas subunidades de la proteína, las cuales cabe destacar tienen características casi idénticas y por lo tanto resulta irrelevante cuál de las dos considerar para este estudio.

Al desarrollar los acoplamientos moleculares *in silico* del ligando-cocristalizado, con la función de scoring MolDock Score, obtuvimos que la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) fue de 0.89Å, lo cual nos indica que el error estructural al realizar el docking molecular con el método seleccionado es menor a un angstrom, por lo tanto podemos considerar que el uso de esta función de scoring es pertinente para realizar el presente trabajo.

- *Acoplamientos moleculares in silico*

Una vez que tenemos preparados nuestros ligandos y blanco terapéutico y que sabemos que el método seleccionado es pertinente para realizar el presente estudio, el siguiente paso es realizar un docking “ciego”, el cual conlleva un escaneo de todas las posibles interacciones a lo largo de la superficie proteica seleccionada. El resultado de lo anterior se representa en la **Figura 4**, donde se observa que los fructanos se van hacia las cavidades laterales (cavidad 2 y 3) y solo la CMC se va a la cavidad central (Cavidad 1), teniendo por ende mayor preferencia a cavidades de menor volumen, lo cual es propiciado por una mejor interacción no covalente en dichas regiones.



**Figura 4.** Docking ciego de los 4 ligandos seleccionados con *BIG16BP*.  
 $LE = E_{\text{acoplamiento}} / \# \text{ átomos pesados (1)}$

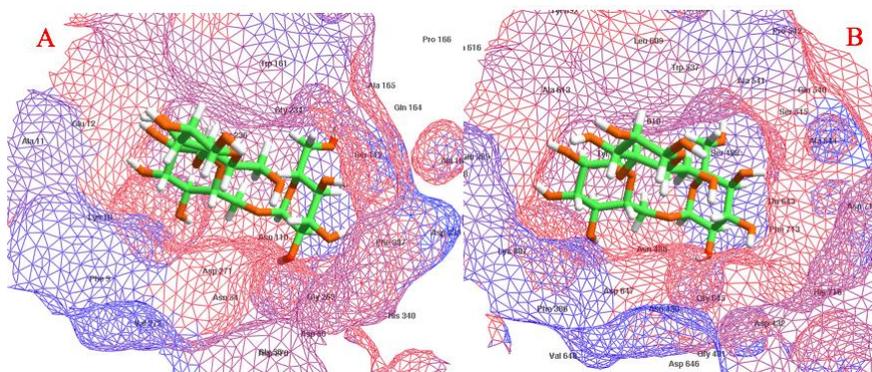
Considerando que los ligandos se posicionaron en tres cavidades de la proteína, se prosiguió a realizar el docking específico en cada una de las cavidades, obteniendo los resultados mostrados en la **Tabla 1**. Cabe destacar que en esta tabla se muestra la eficiencia del ligando (LE, por sus siglas en inglés), la cuál se calcula a partir de la  $E_c$  (1), donde el número de átomos pesados, se refiere a todos los átomos que no sean hidrógeno, por lo tanto dicho valor nos indica el aporte de energía de cada átomo a la interacción ligando-receptor.

**Tabla 1.** Eficiencia del ligando por cavidad, de las moléculas de interés, en kcal/mol.

Ligando	LE		
	Cav1	Cav2	Cav3
<b>1-Cestosa</b>	-2.92	-4.14	-4.09
<b>Neocestosa</b>	-2.49	-3.82	-3.60
<b>CMC</b>	-2.27	-2.99	-2.94
<b>Bifurcosa</b>	-2.43	-3.98	-4.21

La **Tabla 1** nos muestra como, a pesar de que una de las moléculas, la CMC, tuvo mejor interacción, en el docking ciego, con los residuos de la cavidad 1 (cav1), a la hora de realizar los acoplamientos moleculares *in silico* sobre cada una de las cavidades, por separado, las interacciones de esta primera cavidad son básicamente despreciables, comparadas a las de la cav2 y cav3. Gracias a estos resultados podemos considerar como cavidades de interés la 2 y la 3, lo cuál coincide con los resultados experimentales, debido a que en dichas cavidades se encuentra acoplado (co-cristalizado) el ligando 3GLC.

Analizando las dos cavidades de interés mostradas en la **Figura 5**, es claro que son básicamente idénticas, tanto en hidrofobicidad, como en el modo en el que se presenta co-cristalizado el ligando 3GLC, lo cuál es de esperarse, por el hecho de que cada cavidad se encuentra en una subunidad diferente, de las cuáles su estructura primaria y secundaria coinciden casi en un 100%. Por los resultados hasta aquí mostrados podemos considerar que los acoplamientos en cav2 y cav3 mostrarán resultados similares, ya sea con la misma tendencia numérica, como se muestra en la **Tabla 1**, como con el mismo tipo de interacciones, por lo tanto se decide analizar a fondo las interacciones presentes en la cav3, por presentar la LE más favorable (-4.21 kcal/mol, para el caso de la Bifurcosa).



**Figura 5.** Análisis de la hidrofobicidad de la A) Cavidad 2 y B) Cavidad 3. Ambas cavidades tienen acoplado el ligando co-cristalizado 3GLC. El color azul representa superficies hidrofóbicas y el rojo superficies hidrofílicas.

Analizando los resultados de la **Tabla 2**, queda claro que la neocestosa es la que presenta interacciones más favorables, por átomo, con la *BIG16BP*, lo cual se debe principalmente a su bajo número de átomos pesados, así como a una buena interacción con el  $Mg^{2+}$ , relativo a la 1-cestosa que tiene el mismo número de átomos pesados. Cabe destacar que el ligando co-cristalizado, 3GLC, presenta una muy buena interacción, incluso superando a la CMC, que resulta ser la molécula que interactúa de manera menos favorable con el blanco biológico.

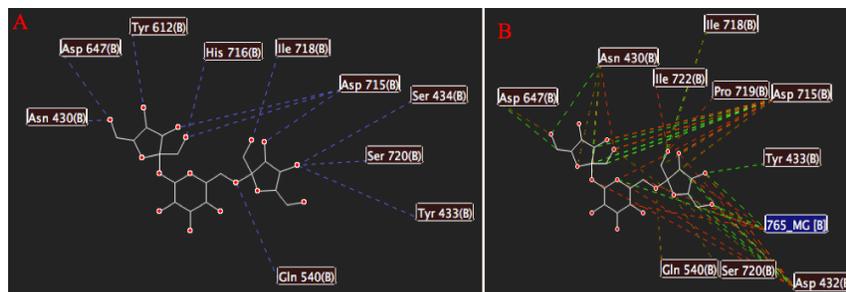
**Tabla 2.** Interacciones ligando-receptor, en kcal/mol, presentes en la cav3.

Ligando	LE	Átomos pesados	E	Hbond	Electros	Ligand-cof
<b>3GLC</b>	-4.04	34	-137.39	-26.96	-0.41	-3.39
<b>1-Cestosa</b>	-4.09	34	-139.12	-20.95	-1.42	-3.54
<b>Neocestosa</b>	-4.21	34	-143.06	-18.79	-2.01	-5.70
<b>CMC</b>	-2.94	57	-167.55	-13.82	3.75	-7.65
<b>Bifurcosa</b>	-3.60	45	-161.91	-12.66	-2.19	-7.90

“LE” es la eficiencia del ligando, “E” es la energía total de interacción ligando-receptor, “Hbond” es la energía debida a los enlaces de hidrógeno, “Electros” se refiere a la energía electrostática total del sistema y “Ligand-cof” es la energía debida a la interacción ligando-cofactor ( $Mg^{2+}$ ).

Los resultados anteriores nos muestran entonces que el orden de afinidad de los fructanos seleccionados y el posible ligando competitivo, CMC, sin considerar los ligandos co-cristalizados, es el siguiente: Neocestosa > 1-Cestosa > Bifurcosa > CMC. Observándose que la carboximetil celulosa no es un polisacárido competitivo en la absorción y distribución de fructanos, teniendo mejor interacción de los fructanos seleccionados, con *BIG16BP*, proteína de membrana seleccionada para dicho estudio.

Finalmente, conociendo que nuestro mejor ligando es la neocestosa, podemos analizar a detalle las interacciones de enlace de hidrógeno e hidrostáticas que presente con los residuos del blanco biológico, lo cual se muestra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Interacciones entre la neocestosa- *BIG16BP* A) de enlace de hidrógeno y B) Electrostáticas. Las interacciones electrostáticas atractivas están denotadas en verde y las repulsivas en rojo.

Es clara la gran cantidad de residuos que interactúa con la neocestosa, ver **Figura 6**, aunque destaca la interacción atractiva que tiene el oxígeno del ciclo glucosídico con el  $Mg^{2+}$ , lo cuál estabiliza más dicha estructura bioactiva, generando una mejor eficiencia del ligando.

### CONCLUSIÓN

A partir de métodos basados en el estado del arte de la química teórica y computacional, fue posible elucidar y detallar las interacciones entre tres fructanos representativos (1-cestosa, bifurcosa y neocestosa) y una proteína de membrana, expresada en un probiótico, *BIG16BP*. Los resultados también nos revelan que, la carboximetil celulosa, polisacárido ampliamente utilizado en la industria de alimentos, a pesar de poseer estructura similar a la de los prebióticos estudiados, no presenta interacciones competitivas con los fructanos modelados en este trabajo.

Con base en lo anterior podemos decir que la proteína transmembrana *BIG16BP* puede jugar un rol importante en el transporte y captación de fructanos con enlaces  $\beta$ -(1,2) y  $\beta$ -(2,6), como son la 1-cestosa, la bifurcosa y la neocestosa. Gracias a lo anterior, podemos demostrar que dicha proteína no solo ayuda a la captación de polisacáridos con enlace  $\alpha$ -(1-6), como está reportado en la literatura, si no también puede estar involucrada con los prebióticos seleccionados en el presente trabajo, cuyas energías de interacción fueron bastante favorables y su estabilización es debida en parte a la interacción con el  $Mg^{2+}$  presente como cofactor. Finalmente podemos decir que la *BIG16BP* puede ser considerada como un primer blanco biológico en la ruta metabólica de fructanos con enlaces  $\beta$ -(1,2) y  $\beta$ -(2,6).

### BIBLIOGRAFÍA

- Allgeyer, L. C., M. J. Miller y S. Y. Lee. (2010). Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *J. Dairy Sci.*, 93, 4471-4479.
- Castro, J. J., A. Gomez, B. A. White, H. J. Mangian, J. R. Loften, y J. K. Drackley. (2016). Effects of prebiotic supplementation depend on site and age. *J. of Dairy Sci.*, 99, 9682-9702.
- Ejby, M., Fredslund, F., Andersen, J. M., Žagar, A. V., Henriksen, J. R., Andersen, T. L., . . . Hachem, M. A. (2016). An ATP Binding Cassette Transporter Mediates the Uptake of  $\alpha$ -(1,6)-Linked Dietary Oligosaccharides in *Bifidobacterium* and Correlates with Competitive Growth on These Substrates. *J. Biol. Chem.*, 29(38), 20220-2023.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., . . . Fox, D. J. (2009). Gaussian 09 (Version C.01): Wallingford CT.
- Gilad, O, Svensson, B, Viborg, A.H, Stuer-Lauridsen, B. y Jacobsen, S. (2011). The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals prions with putative roles in probiotic affects. *Proteomics*, 11, 2503-2514.
- Janer, C., Arigoni, F., Lee, B.H., Peláez, C y Raquena, T. (2005). Enzymatic Ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* To Hydrolyze Milk Proteins: Identification and Characterization of Endopeptidase O. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8460-8465.
- Kailasapathy, K. y J. Chin. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*, 78, 80-88.
- Perdew, J. P., Burke, K., & Ernzerhof, M. (1996). *Phys. Rev. Lett.*, 77, 3865-3868.
- Ponce S., Jamné A. Macías B., E. R. Soltero M., J. F. Armando; Fernández E., V V.; Zúñiga P., Virgilio; Escalona B, H. B. (2008). Physical-Chemical and non-linear rheological properties of aqueous solutions of agave fructans. *e-Gnosis*, 6, 1-23.

## Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

- Ranadheera, R. D. C. S., S. K. Baines y M. C. Adams. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43, 1-7.
- Reyes E., González A., Luna J.F. (2011). Uso de carboximetilcelulosa como matriz polimérica en la síntesis de nuevos materiales híbridos. *Redalyc*, 14, 459-465.
- Stewart, J. J. P. (2007). *J. Mol. Mod.*, 13, 1173-1213.
- Thomsen, R., & Christensen, M. (2006). *J. Med. Chem.*, 49, 3315-3321.
- Ulloa A, Espinosa H. Cruz., G. K. Rosas P. Ulloa Rangel B. E. Ramírez Ramírez J. C. (2010). Los Fructanos y su papel en la promoción de la salud. *e-Gnosis*, 5, Pag. 59-63.
- Varghese, J. N., Hrmvova, M., & Fincher, G. B. (1999). Three-dimensional structure of a barley  $\beta$ -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure*, 7, 179-190.
- Vijn, I., & Smeekeens, S. (1999). Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiol.*, 120, 351.
- Yang, J., & Chen, C. (2004). *Proteins*, 55, 288-304.