

EVIDÊNCIAS ESTRUTURAIS DE POSSÍVEL PROCESSAMENTO C-TERMINAL NA LECTINA BVL-I

MOREIRA, Gustavo¹; PINTO, Luciano¹; CONCEIÇÃO, Fabricio¹

¹Centro Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia/UFPeI
Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: moreira.gmsg@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas com atividade ligante sobre pelo menos um carboidrato, podendo ser encontradas em diversos organismos. Além disso, não possuem propriedade imunológica e podem apresentar atividade catalítica (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Devido à habilidade de reconhecer e se ligarem reversivelmente a carboidratos específicos, podem estar envolvidas em diferentes eventos biológicos como reconhecimento e diferenciação celular, formação de órgãos, infecção, interação parasito-hospedeiro e metástase (GANGULY & DAS, 1994; LAM & NG, 2011). A caracterização da estrutura tridimensional dessas proteínas permite o melhor entendimento acerca da base da interação entre lectina e ligante. Várias lectinas já tiveram sua estrutura tridimensional elucidada (LORIS *et al.*, 1998), etapa crucial para a eleição dessas moléculas como potenciais ferramentas biotecnológicas. A lectina I de *Bauhinia variegata* (BVL-I) é uma lectina de domínio simples que se liga ao monossacarídeo D-galactose (PINTO *et al.*, 2008). Apesar de ter passado por parcial caracterização, a alta glicosilação e a existência de isoformas dificultam o processo de definição de sua estrutura tridimensional. Sendo assim, ferramentas computacionais de predição estrutural se tornam excelentes alternativas para seu estudo. Inúmeras lectinas de domínio simples, semelhantes à BVL-I, sofrem modificações pós-traducionais tanto na remoção de um peptídeo sinal na região N-terminal quanto na excisão de um peptídeo de função pouco conhecida na porção C-terminal (YOUNG *et al.*, 1995). Porém, esse último fenômeno não é descrito para BVL-I. Portanto, esse trabalho busca empregar ferramentas computacionais de predição estrutural como alternativa ao estudo da estrutura de BVL-I e analisar seu possível processamento da região C-terminal através de modelos preditos.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A aquisição da sequência de aminoácidos da BVL-I, as predições estruturais com os programas SwissModel e 3D Jigsaw e a sobreposição e manipulação das imagens foram feitas conforme descrito por MOREIRA *et al.* (2010). Além das estruturas já obtidas pelos dois programas, uma nova predição de BVL-I (BVL-I/BH1) foi feita com o uso do programa Bhageerath-H (MOHANTY *et al.*). Para analisar a influência da porção C-terminal na estrutura de BVL-I, seus 18 últimos resíduos de aminoácidos foram retirados e submetidos à predição pelos programas 3D Jigsaw (BVL-I/3DJ2) e Bhageerath-H (BVL-I/BH2). A lectina de soja (SBA) foi utilizada como modelo comparativo da região C-terminal, pois já possui estrutura e processamento descritos (MANDAL *et al.*, 1994). A estrutura de SBA com sua porção C-terminal (SBA1) foi predita pelo Bhageerath-H utilizando a sequência direta do cDNA (*GenBank*: P05046), sem seu peptídeo sinal (1-32 aminoácidos); enquanto sua estrutura sem tal região (SBA2) foi obtida diretamente do *Protein Data*

Bank (PDB, código: 1SBF). A qualidade das predições foi aferida pelo programa QMEAN (BENKERT *et al.*, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O programa Bhageerath-H foi utilizado com o intuito de obter melhores modelos para análise estrutural. A predição BVL-I/BH1 apresentou características melhores que as dos outros programas. Ao contrário do SwissModel e do 3D Jigsaw (MOREIRA *et al.*, 2010), nenhum resíduo de aminoácido foi eliminado da sequência original de BVL-I. Ainda, foi possível identificar as três folhas características de lectinas de leguminosas (Figura 1A) (LORIS *et al.*, 1998). Porém, a alça C-terminal de aproximadamente 18 aminoácidos, presente na predição anterior BVL-I/3DJ1, se apresenta isolada da estrutura (Figura 1A, caixa vermelha). Mesmo sendo um programa híbrido que utiliza predições por homologia e cálculos *ab initio*, o Bhageerath-H não foi capaz de prever a posição exata dos resíduos que compõem essa porção e corrigir o erro existente em BVL-I/3DJ1. A nova predição BVL-I/BH2 manteve as folhas características que caracterizam lectinas de leguminosas (Figura 1B) de modo semelhante como em BVL-I/BH1. Além disso, essa predição se mostrou melhor que BVL-I/3DJ2, a qual continuou defeituosa ao manter suas folhas pouco definidas (Figura 1C).

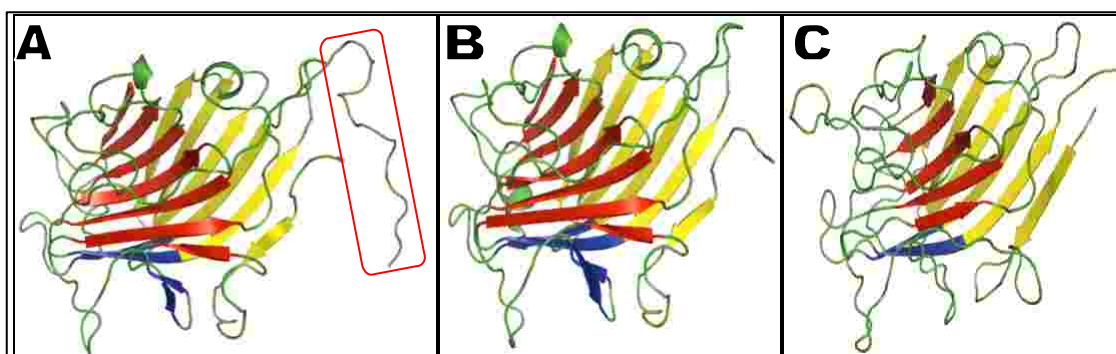


Figura 1: estrutura geral das predições feitas com destaque para as folhas características de lectinas de leguminosas: folha frontal (vermelho), folha posterior (amarelo) e folha S (azul). (A) BVL-I/BH1 com região C-terminal de 18 resíduos de aminoácidos inserida na caixa vermelha. (B) BVL-I/BH2. (C) BVL-I/3DJ2, na qual as folhas não são bem definidas.

Em algumas lectinas de domínio simples é comum haver processamento pós-traducional da região C-terminal (BONNEIL *et al.*, 2004). Entretanto, esse processamento não é bem definido, uma vez que os sítios não são conservados nem na mesma lectina nem em lectinas diferentes (YOUNG *et al.*, 1995). Além disso, sabe-se que os diferentes processamentos da região C-terminal causam modificações na estrutura e função dessas proteínas e dão origem a várias isoformas (MANDAL *et al.*, 1994). Para analisar o efeito da região C-terminal na taxa de erro do programa QMEAN, foram utilizadas as estruturas SBA1 e SBA2, uma vez que o processamento C-terminal já é descrito para SBA (MANDAL *et al.*, 1994). Em SBA1 ocorre aumento no erro de predição na região C-terminal (Figura 2A). Já em SBA2, não houve erro considerável, uma vez que sua estrutura já é descrita. A predição BVL-I/SwissModel apresenta taxa de erro aceitável (Figura 2B), mas sua predição possui uma série de defeitos (MOREIRA *et al.*, 2010). Assim como para SBA1, as predições BVL-I/3DJ1 e BVL-I/BH1 demonstraram aumento do erro na região C-terminal (Figuras 2C e 2D). Contudo, os resultados de erro para BVL-I/3DJ2 e BVL-I/BH2 (Figuras 2E e F) não apresentaram tal aumento, se

assemelhando com a taxa normal de SBA2. Tal constatação remete que a lectina BVL-I deve sofrer o processamento C-terminal, gerando várias isoformas de maneira semelhante como ocorre com SBA (MANDAL *et al.*, 1994).

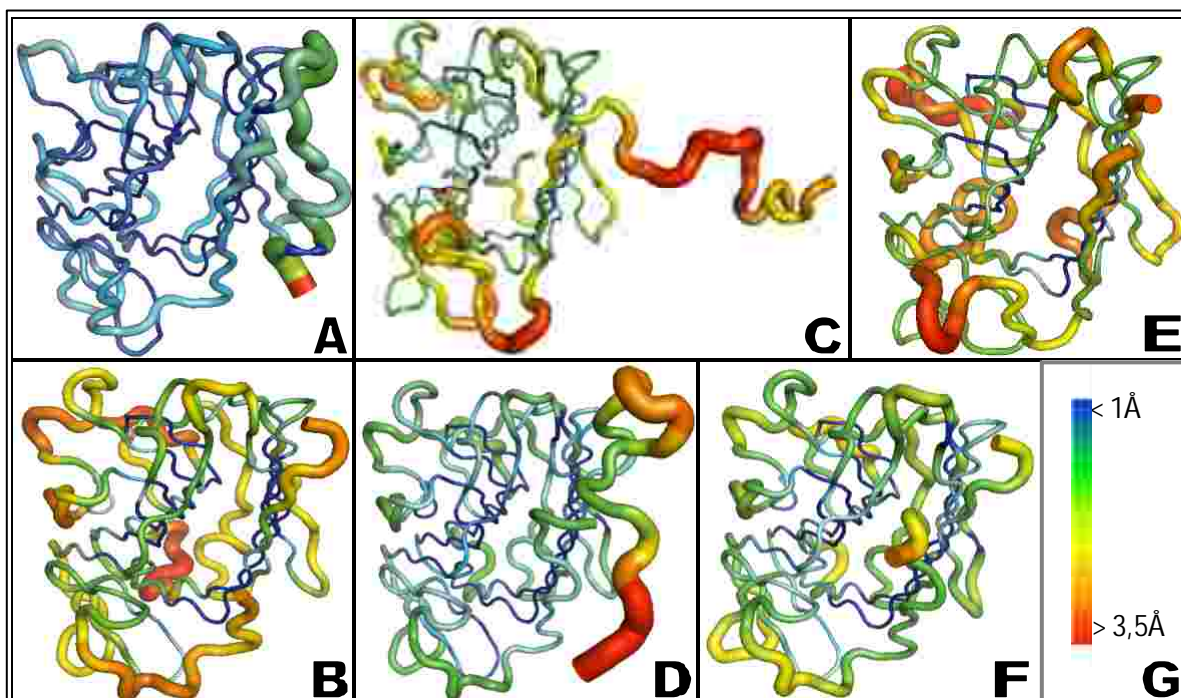


Figura 2: taxa de erro estrutural determinado pelo programa QMEAN. (A) taxa de erro para SBA1. (B) taxa de erro para BVL-I/SwissModel. (C) taxa de erro para BVL-I/3DJ1 (D) taxa de erro para BVL-I/BH1. (E) taxa de erro para BVL-I/3DJ2. (F) taxa de erro para BVL-I/BH2. (G) escala de cores para taxa de erro: quanto menor o valor (mais próximo do azul) melhor é a predição; quanto maior o valor (mais próximo do vermelho) pior é a predição.

4 CONCLUSÕES

Em comparação com outros programas utilizados, como SwissModel e 3D Jigsaw, o Bhageerath-H se mostrou mais eficiente em suas predições. Portanto, ele é o mais indicado para a predição desse tipo de proteína, já que as características de lectinas leguminosas analisadas foram mantidas para BVL-I bem como todos os aminoácidos da sequência proteica. Por ser uma lectina de domínio simples, BVL-I possivelmente sofre um processamento em sua porção C-terminal. No entanto, tal fenômeno ainda não foi estudado nessa lectina, colocando este trabalho como o primeiro a realizar esse tipo de análise. Os programas 3D Jigsaw e Bhageerath-H não eliminaram os aminoácidos da região C-terminal de BVL-I, permitindo analisar seu erro de predição através do programa QMEAN. A alta taxa de erro na região C-terminal das predições BVL-I/BH2 e SBA2, somada ao fato de que nem os cálculos *ab initio* de Bhageerath-H foram capazes de agregar tal porção na estrutura de BVL-I, sugerem que essa lectina sofre processamento semelhante ao que ocorre com SBA. Outra evidência de tal processamento é que o programa QMEAN possui a particularidade de não apresentar boas pontuações em regiões proteicas transmembrana. Assim, é lúcido acreditar que os resíduos que compõem tal região atuam como um segundo peptídeo sinal que encaminha a lectina para alguma membrana celular, como sugerido para outras lectinas que sofrem tal modificação pós-traducional. Os resultados aqui apresentados buscam aprimorar a qualidade da predição estrutural da proteína BVL-I. Além disso, possibilitam melhor entendimento sobre as características desta lectina, permitindo novas estratégias para obtê-la na

sua forma funcional bem como em maior quantidade, já que esses são fatores limitantes na sua aplicação como produto biotecnológico.

5 REFERÊNCIAS

BENKERT, Pascal; KÜNZLI, Michael; SCHWEDE, Torsten. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 510-514, 2009.

BONNEIL, Eric; YOUNG, Martin; LIS, Halina; SHARON, Nathan; THIBAUT, Pierre. Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the *Erythrina* genus by mass spectrometry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 241–249, 2004.

GANGULY, Chaiti & DAS, Sukta. Plant lectins as inhibitors of tumour growth and modulators of host immune response. **Chemotherapy**, v. 40, n. 4, p. 272-278, 1994.

LAM, Sze Kwan & NG, Tzi Bun. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45–55, 2011.

LORIS, Remy; HAMELRYCK, Thomas; BOUCKAERT, Julie; WYNS, Lode. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9-36, 1998.

MANDAL, Dipak; NIEVES, Edward; BHATTACHARYYA, Lokesh; ORR, George; ROBOZ, John; YU, Qui-tao; BREWER, Fred. Purification and characterization of three isolectins of soybean agglutinin: Evidence for C-terminal truncation by electrospray ionization mass spectrometry. **European Journal of Biochemistry**, v.221, p. 547-553, 1994.

MOHANTY, Pallavi.; LAKHANI, Bharat.; JAYRAM, B.. Bhageerath-H: A Homology *ab initio* Hybrid Webserver for Protein Tertiary Structure Prediction. **Artigo em desenvolvimento**.

MOREIRA, Gustavo; PINTO, Luciano; CONCEIÇÃO, Fabricio. Predição Comparativa da Estrutura Tridimensional da Lectina BVL-I In: **CIC UFPEL**, XIX, Pelotas, 9-12 de Novembro, 2010. Resumos, Pelotas: UFPel, 9-12 de Novembro, 2010.

PEUMANS, Willy; VAN DAMME, Els. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PINTO, Luciano; NAGANO, Celso; OLIVEIRA, Taian; MOURA, Tales; SAMPAIO, Alexandre; DEBRAY, Henri; PINTO, Vicente; DELLAGOSTIN, Odir; CAVADA, Benildo. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Biosciences**, v.33, n.3, p. 355–363, 2008.

YOUNG, Martin; WATSON, David; YAGUCHI, Makoto; ADAR, Rivka; ARANGO, Rafael; RODRIGUEZ-ARANGO, Esperanza; SHARON, Nathan; BLAY, Pearl; THIBAUT, Pierre. C-terminal Post Translational Proteolysis of Plant Lectins and Their Recombinant Forms Expressed in *E. coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 6, p. 2563-70, 1995.