

## IDENTIFICAÇÃO *in silico* DE $\alpha$ -HÉLICE NA REGIÃO C-TERMINAL DA LECTINA BVL-II E DEFINIÇÃO DE SUAS POSSÍVEIS FUNÇÕES ESTRUTURAIS

**MOREIRA, Gustavo<sup>1</sup>; PINTO, Luciano<sup>1</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Centro Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia/UFPeL  
Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: [moreira.gmsg@gmail.com](mailto:moreira.gmsg@gmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas com atividade ligante sobre, pelo menos, um carboidrato (LIS & SHARON, 1998). Pelo fato de se ligarem reversivelmente em açúcares, elas podem estar envolvidas em diferentes eventos, como o reconhecimento e diferenciação celular, formação de órgãos, infecções virais, interação parasito-hospedeiro e metástase (LAM & NG, 2011). Apesar de presentes em diversos organismos, as lectinas de plantas são as mais estudadas devido a fácil purificação e caracterização. Na célula vegetal, essas proteínas são inicialmente sintetizadas como precursores inativos que, quando sofrem modificações pós-traducionais, se tornam ativos (BEZERRA *et al.*, 2006). Lectinas de cadeia simples, como a de soja (SBA) e *Dolichos biflorus* (DBL) são processadas tanto na remoção de um peptídeo sinal na região N-terminal quanto de outro na porção C-terminal (YOUNG *et al.*, 1995). As lectinas de *Bauhinia variegata* (BVL-I e BVL-II) são proteínas de cadeia simples que se ligam ao monossacarídeo D-galactose (PINTO *et al.*, 2008). Nosso grupo vem trabalhando com o estudo da estrutura de BVL-I através de predição (MOREIRA *et al.*, 2010), uma vez que a alta glicosilação e a existência de isoformas dificultam o processo de definição de sua estrutura tridimensional. Através desses trabalhos, foi possível identificar uma possível clivagem na porção C-terminal de BVL-I (MOREIRA *et al.*, 2011), de modo semelhante como ocorre em outras lectinas. Recentemente, outro estudo sobre BVL-I e -II permitiu identificar padrões de associação quaternária entre essas duas proteínas (MOREIRA *et al.*, 2012). No entanto, a função da presença ou ausência da região C-terminal em BVL-II ainda não foi elucidada. Assim, o presente trabalho busca compreender as funções da porção C-terminal de BVL-II a partir de modelos tridimensionais gerados por predição estrutural.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

As predições estruturais do programa Bhageerath-H, a análise de confiabilidade do programa QMEAN e a manipulação das imagens foram feitas conforme descrito por MOREIRA *et al.* (2010; 2011). A sequência de BVL-II (*GenBank*: ACB87491.1) sem seu peptídeo sinal (1-28 aminoácidos) foi utilizada para gerar modelos estruturais pelo Bhageerath-H (BVL-II/BH1 e BVL-II/BH $\alpha$ ). Para analisar a influência da porção C-terminal na estrutura de BVL-II, seus 15 últimos resíduos de aminoácidos foram retirados e submetidos à predição pelo mesmo programa (BVL-II/BH2). As lectinas SBA e DBL foram utilizadas como modelos comparativos da região C-terminal, pois já possuem estrutura e processamento descritos. A estrutura de SBA com sua porção C-terminal (SBA/BH) 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 foi obtida

diretamente do *Protein Data Bank* (PDB, código: 1SBF). Para as análises de DBL, suas estruturas com (DBL:A) e sem a região C-terminal (DBL:C) foram adquiridas do PDB (código: 1BJQ, cadeias A e C).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As predições resultantes do programa Bhageerath-H mostraram duas estruturas possíveis para BVL-II: (1) BVL-II/BH1, que contém as folhas- $\beta$  características de lectinas de plantas leguminosas, mas sua região C-terminal se apresenta disforme (Fig. 1A); (2) e BVL-II/BH $\alpha$ , que apresentou um defeito em sua folha posterior, mas a região C-terminal em formato de  $\alpha$ -hélice (Fig. 1B). A predição BVL-II/BH2 manteve as folhas- $\beta$  que caracterizam lectinas de leguminosas (Fig. 1C) de modo semelhante como em BVL-II/BH1.

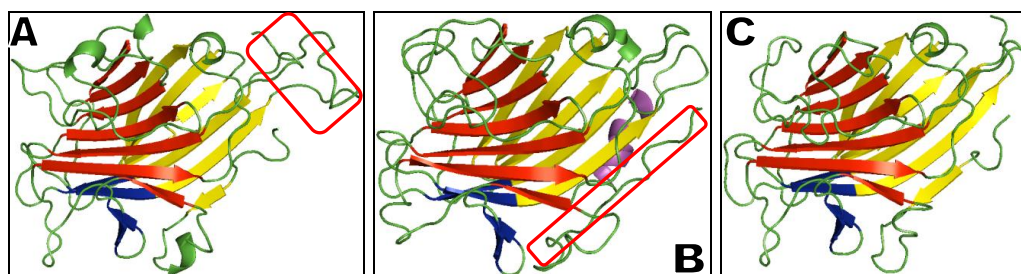


Figura 1 - Estrutura geral das predições feitas com destaque às folhas- $\beta$  características de lectinas de leguminosas: folha frontal (vermelho), folha posterior (amarelo) e folha S (azul). **(A)** BVL-II/BH1, com região C-terminal disforme de 15 resíduos de aminoácidos (caixa vermelha). **(B)** BVL-II/BH $\alpha$ , com sua  $\alpha$ -hélice C-terminal (magenta) e defeito na folha posterior (caixa vermelha). **(C)** BVL-II/BH2.

Tanto em SBA quanto em DBL, a formação da estrutura quaternária é determinada pela presença da sequência Ser-X-Ile-X-Ser. No entanto, essa sequência não está presente em BVL-I e BVL-II. Em vez disso, outro padrão de associação quaternária determina semelhança com GS-I e GS-IV, permitindo a formação de dímeros e tetrâmeros (MOREIRA *et al.*, 2012). As estruturas SBA/BH, DBL:A e BVL-II/BH $\alpha$  apresentam porções C-terminais em formato de  $\alpha$ -hélice, as quais são semelhantes quando sobrepostas (Fig. 2). Assim, é possível inferir funções dessa região de modo comparativo. Em SBA e DBL, a  $\alpha$ -hélice presente na região C-terminal é capaz de estabilizar a estrutura quaternária em dímeros ou tetrâmeros (HAMELRYCK *et al.*, 1999). Assim, pode-se deduzir que a  $\alpha$ -hélice de BVL-II, juntamente com o padrão de associação de GS-I e GS-IV, resulta em um tipo diferente de estrutura quaternária na qual BVL-I e BVL-II podem se associar e, ainda, estabilizar suas interações através da  $\alpha$ -hélice C-terminal de BVL-II.

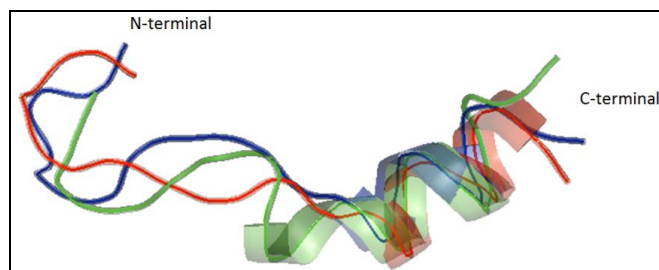


Figura 2 - Sobreposição dos 20 aminoácidos da região C-terminal de BVL-II/BH $\alpha$  (verde), SBA/BH (azul) e DBL:A (vermelho). Devido à presença de uma  $\alpha$ -hélice, as três estruturas apresentam grande homologia estrutural, o que implica na correlação de estrutura quaternária entre essas lectinas.

Algumas lectinas de domínio simples, tais como SBA e DBL, sofrem processamentos pós-traducionais na região C-terminal. Esse processamento não apresenta sítios conservados nem únicos, o que torna esse fenômeno pouco compreendido até o momento (YOUNG *et al.*, 1995). O programa QMEAN foi empregado para analisar o efeito da região C-terminal na taxa de erro das predições. Como descrito por MOREIRA *et al.* (2011), a estrutura de SBA do PDB (Fig. 3A) não apresenta taxas de erro elevadas como as de SBA/BH (Fig. 3B). Utilizando o erro máximo de GS-IV (código PDB: 1LEC) como referência (Fig. 3C), esse padrão de SBA não ocorre para BVL-II, uma vez que tanto BVL-II/BH1 (Fig. 3D) quanto BVL-II/BH2 (Fig. 3E) apresentam altas taxas de erro elevadas ao final da sequência. Entretanto, as taxas de erro de BVL-II/BH $\alpha$  não se mostram aumentadas na porção C-terminal (Fig. 3F). Tal padrão se assemelha ao de DBL, uma vez que DBL:A (Fig. 3G) não apresenta aumento de erro na região C-terminal quando se usa o erro máximo resultante de DBL:C (Fig. 3H) como referência.

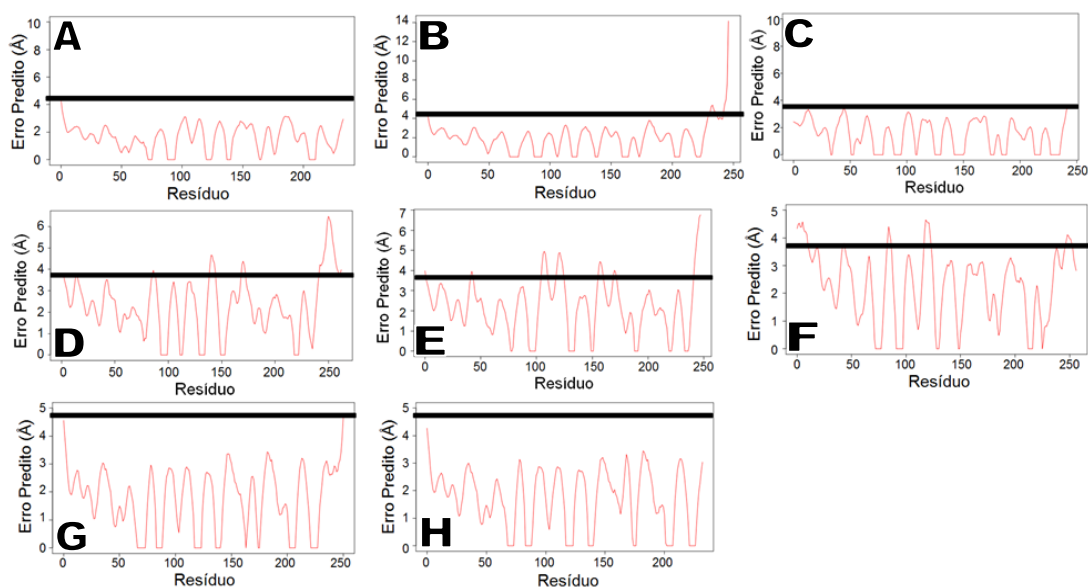


Figura 3 - Taxas de erro geradas pelo programa QMEAN para as estruturas estudadas. A linha preta indica o erro máximo relativo às estruturas do PDB. Qualquer valor acima dessa linha é considerado um erro anormal. **(A)** SBA (1SBF). **(B)** SBA/BH, que apresenta erro exacerbado na região C-terminal. **(C)** GS-IV (1LEC). **(D)** BVL-II/BH1, que apresenta erro exacerbado na região C-terminal. **(E)** BVL-II/BH2, que continuou com alto erro C-terminal mesmo sem seus últimos 15 aminoácidos. **(F)** BVL-II/BH $\alpha$ , que apresenta região C-terminal em formato de  $\alpha$ -hélice. **(G)** DBL:A (1BJQ, cadeia A). **(H)** DBL:C (1BJQ, cadeia C).

A predição BVL-II/BH1 mostra que sua região C-terminal pode ser retirada por processamento pós-traducional. No entanto, o aumento da taxa de erro de BVL-II/BH2 e a predição BVL-II/BH $\alpha$  revelaram que as propriedades dessa lectina são parcialmente diferentes de BVL-I. A  $\alpha$ -hélice C-terminal presente em BVL-II/BH $\alpha$  permite deduzir que essa região tem função de estabilizar a formação de dímeros e tetrâmeros com BVL-I de modo semelhante como ocorre em SBA e DBL. O fato de não apresentarem o padrão de associação quaternária de SBA e DBL, e sim de GS-I e GS-IV, remete que BVL-I e -II formam um tipo diferente de estrutura quaternária. Nesse caso, ela seria semelhante à de GS-I e GS-IV, mas com estruturas de  $\alpha$ -hélice estabilizantes situadas na região intermediária dos dímeros, ou central dos tetrâmeros.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho permitem compreender melhor as propriedades dessas lectinas, possibilitando que novos trabalhos de cunho biotecnológico sejam desenvolvidos. Além disso, as aplicações de ferramentas *in silico* ajudam no aprimoramento de métodos computacionais para análises biológicas.

## 5 REFERÊNCIAS

BEZERRA, Walderly; PAIVA, Cristina; MOREIRA, Renato; GRANGEIRO, Thalles. Establishment of a heterologous system for the expression of *Canavalia brasiliensis* lectin: a model for the study of protein splicing. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 216-223.

HAMELRYCK, Thomas; LORIS, Remy; BOUCKAERT, Julie; DAO-THI, Minh-Hoa; STRECKER, Gerard; IMBERTY, Anne; FERNANDEZ, Elias; WYNS, Lode; ETZLER, Marilynn. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 286, n. 4, p. 1161-77.

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

LIS, Halina & SHARON, Nathan. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674.

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.

MOREIRA, Gustavo; PINTO, Luciano; CONCEIÇÃO, Fabricio. Evidências Estruturais de Possível Processamento C-terminal na Lectina BVL-I In: **CIC UFPEL**, XX, Pelotas, 8-11 de Novembro, 2011.

MOREIRA, Gustavo; PINTO, Luciano; CONCEIÇÃO, Fabricio. Identificação de Padrões de Estrutura Quaternária nas Lectinas BVL-I e BVL-II In: **Jornada de Biotecnologia**, 2ª, Pelotas, 22-24 de Maio, 2012.

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; THIBAULT, 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.