

PREDIÇÃO COMPARATIVA DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LECTINA BVL-I

MOREIRA, Gustavo¹; PINTO, Luciano¹

CONCEIÇÃO, Fabricio¹

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

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas de origem não-imune capazes de se ligar com especificidade a diversos açúcares sob diferentes níveis de afinidade. Tais proteínas podem ser isoladas de inúmeros organismos, principalmente de plantas. Sua classificação é feita de acordo com o número de domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) e com a presença ou não de sítios catalíticos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Várias lectinas já tiveram sua estrutura tridimensional elucidada (LORIS *et al.*, 1998). Tais trabalhos forneceram informações detalhadas sobre seus CRD e propuseram, inclusive, seus mecanismos de ação em uma possível rota metabólica. A lectina 1 de *Bauhinia variegata* (BVL-I) se liga preferencialmente ao monossacarídeo D-galactose e, apesar de ter sido parcialmente caracterizada (PINTO *et al.*, 2008), sua estrutura tridimensional ainda não foi determinada, visto que essa proteína é intensamente glicosilada, mecanismo que dificulta sua cristalização e consequente determinação de sua estrutura. Dessa forma, o presente trabalho busca a predição da estrutura da BVL-I nativa com base em estruturas já depositadas em bancos de dados de modo a determinar os sítios ligantes a carboidratos e as principais características moleculares e estruturais que podem estar relacionadas com sua função.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A sequência de aminoácidos da BVL-I nativa foi obtida no GenBank (código de acesso: ABQ45362). Por se tratar de uma proteína que sofre modificações pós-traducionais, seu peptídeo sinal (1-28 aminoácidos) foi desprezado, caracterizando sua forma ativa final. A predição da estrutura dessa proteína foi feita por dois programas de acesso *online* para análise estrutural comparativa: SwissModel (KIEFER *et al.*, 2001) e 3D Jigsaw (BATES *et al.*, 2001). O primeiro utilizou como base a lectina 4 de *Griffonia simplicifolia* (GS-IV). Portanto, sua sequência de aminoácidos para o alinhamento foi obtida no GenBank (código de acesso: 1LECA) e sua estrutura para as sobreposições pelo Protein Data Bank (PDB, código de acesso: 1LEC). Utilizando o programa BioEdit v7.0.5 (HALL, 1999), as duas sequências foram alinhadas por *slide ends* e uma matriz de similaridade entre elas foi gerada pelo algoritmo BLOSUM62. Para sobrepor e manipular as estruturas obtidas da BVL-I e da GS-IV, utilizou-se o programa PyMol v0.99rc6. A predição obtida pelo 3D Jigsaw não informa a lectina utilizada como base, mas a molécula gerada por ele foi analisada e manipulada do mesmo modo que a predição do SwissModel. O controle para o sítio de ligação à D-galactose foi feito com a estrutura da lectina de *Erythrina corallodendron* (EcorL), que teve sua sequência do GenBank (código de acesso: 1AXZA) alinhada e sua estrutura do PDB (código de acesso: 1AXZ) sobreposta à BVL-I com os mesmos programas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a predição da estrutura da lectina BVL-I, o SwissModel utilizou como molde a lectina GS-IV. O alinhamento das sequências dessas duas proteínas foi feito por *slide ends*, pois essa opção representa a sobreposição estrutural de proteínas. Em seguida, a matriz BLOSUM62 indicou 75,66% de similaridade, mostrando que a utilização de GS-IV como molde para a predição da estrutura de BVL-I é confiável. Assim, a BVL-I apresenta os três conjuntos de folhas- β característicos de lectinas de leguminosas: folha frontal, folha posterior e folha S (Figura 1A e 1B) (LORIS *et al.*, 1998). No entanto, o SwissModel adaptou a sequência analisada de modo que sua estrutura fique semelhante com uma já existente. Nesse caso, os 7 primeiros e os 18 últimos resíduos de aminoácidos da BVL-I foram desprezados, o que torna a predição menos confiável. Em vista de solucionar esse problema, o programa 3D Jigsaw foi utilizado. Sua predição descartou apenas os 2 primeiros resíduos de aminoácidos, porém a estrutura das folhas- β características de lectinas de leguminosas não ficou bem definida (Figura 1C). O sítio de interação com o açúcar (DELBAERE *et al.*, 1993) da BVL-I/SwissModel se mostrou altamente conservado (Figura 2A), ao contrário do sítio da BVL-I/3D Jigsaw, que foi bastante divergente (Figura 2B). Pelo 3D Jigsaw, os 16 últimos resíduos da BVL-I tiveram sua estrutura determinada apenas pela interação entre seus monômeros, interferindo na formação das folhas de lectinas de leguminosas, mostrada na Figura 1C. Esse tipo de predição ocorreu porque nenhuma lectina com estrutura tridimensional já determinada possui sequência semelhante a esses 16 resíduos de aminoácidos. Assim, essa região é representada como uma alça (Figura 2C) que, do modo como foi predita, dificilmente contribuirá para a atividade da BVL-I.

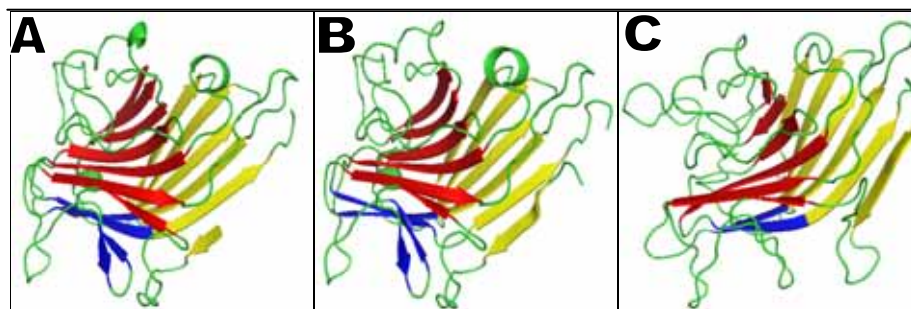


Figura 1: representação das folhas- β características de lectinas de leguminosas: folha frontal (vermelho); folha posterior (amarelo); e folha S (azul). (A) Estrutura da BVL-I/SwissModel. (B) estrutura da GS-IV. (C) Estrutura BVL-I/3D Jigsaw, na qual a folha S não é bem definida.

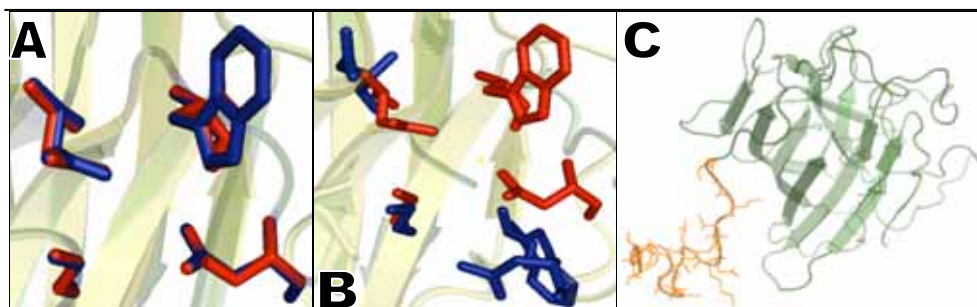


Figura 2: detalhe do CRD das predições e da alça de 16 aminoácidos. (A) BVL-I/SwissModel sobreposta à GS-IV. (B) BVL-I/3D Jigsaw sobreposta à GS-IV. Em A e B, os quatro aminoácidos responsáveis pela interação com o açúcar são mostrados para BVL-I (■) e para GS-IV (■). (C) Estrutura da BVL-I/3D Jigsaw com a alça de 16 aminoácidos na região C-terminal marcada (■).

A lectina usada como modelo (GS-IV) possui algumas características particulares. Uma delas é que a interação com D-galactose ocorre apenas quando esse açúcar está complexado com outros (DELBAERE *et al.*, 1993). Além disso, possui uma alça de 5 aminoácidos, situada perto da região ligante, a qual estabiliza sua atividade (LORIS *et al.*, 1998). Por comparação, a BVL-I também possui essa alça, mas, ao contrário da GS-IV, ela é capaz de ligar à D-galactose não-complexada (PINTO *et al.*, 2008). Desse modo, a alça aparentemente inutilizada, mostrada na Figura 2C, pode ter efeito estabilizante no CRD para o açúcar não-complexado, conferindo uma estrutura diferente entre as predições (Figura 3A e 3B). As poucas lectinas de leguminosas que se ligam preferencialmente à D-galactose livre e que tiveram sua estrutura tridimensional determinada não são similares à BVL-I, impossibilitando o aumento da qualidade das predições. Alternativamente, a estrutura da lectina EcorL foi utilizada, já que também se liga à D-galactose livre, porém não preferencialmente (ELGAVISH & SHAANAN, 1998). A mesma apresenta significativa similaridade com a BVL-I (52,19%), denotada pela matriz BLOSUM62 após alinhamento por *slide ends*. Mesmo com a grande semelhança entre essas lectinas, as predições de BVL-I, quando sobrepostas à EcorL, mostram diferenças estruturais significativas tanto na alça estabilizante (Figura 3C e 3D) quanto no motivo de ligação ao açúcar (Figura 3E e 3F). Isso reforça a idéia de que a alça representada ao final da BVL-I/3D Jigsaw pode interferir na estrutura de suas folhas características de lectinas de leguminosas e nas regiões ligantes de modo a explicar a interação preferencial com D-galactose livre.

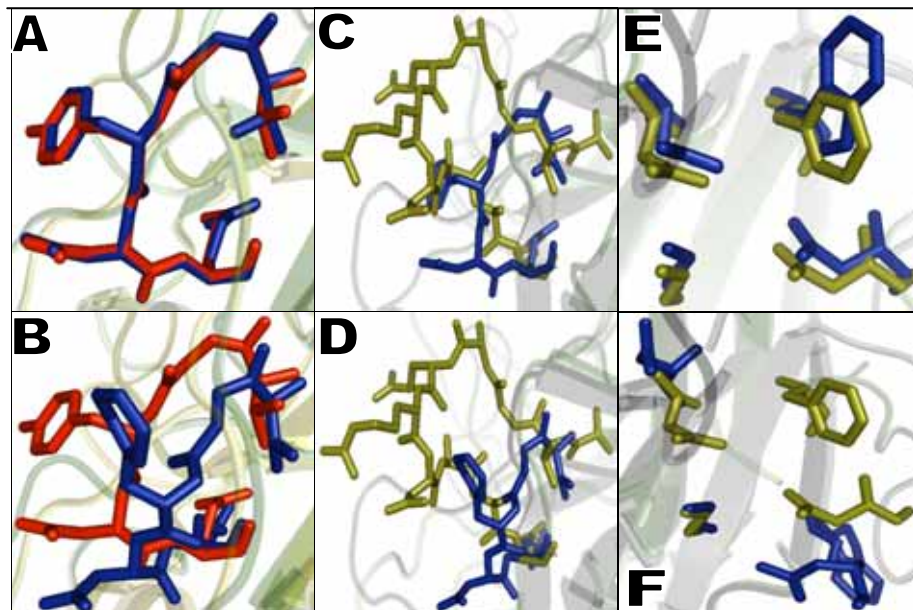


Figura 3: sobreposições estruturais da alça e dos resíduos do CRD. (A) BVL-I/SwissModel sobreposta à GS-IV. (B) BVL-I/3D Jigsaw sobreposta à GS-IV. (C) BVL-I/SwissModel sobreposta à EcorL. (D) BVL-I/3D Jigsaw sobreposta à EcorL. (E) BVL-I/SwissModel sobreposta à EcorL. (F) BVL-I/3D Jigsaw sobreposta à EcorL. Estão marcadas as regiões para BVL-I (■), GS-IV (■) e EcorL (■).

4 CONCLUSÕES

A análise comparativa permitiu definir algumas propriedades sobre a classificação e atividade da BVL-I. Embora o SwissModel descarte um número considerável de aminoácidos da BVL-I durante o processo de modelagem, a estrutura predita apresenta características compatíveis às apresentadas por lectinas

de leguminosas. No entanto, essa informação não permite explicar sua atividade diferenciada em relação à lectina GS-IV usada como molde, uma vez que os motivos de atividade foram altamente semelhantes entre elas. O 3D Jigsaw desprezou apenas os 2 primeiros resíduos de aminoácidos da BVL-I, mas sua estrutura não foi condizente com a de uma lectina típica de leguminosas. Apesar desses fatores, a sobreposição das predições com o molde GS-IV e com a lectina controle EcorL permitiu observar que a BVL-I apresenta uma porção C-terminal que pode estar relacionada com sua atividade ligante à D-galactose livre. A explicação para a atividade do seu CRD é de crucial entendimento do papel dessa lectina em sinalizações celulares que, por exemplo, estimulam ou inibem a proliferação celular. Além de incrementar os conhecimentos acerca da BVL-I, os resultados obtidos servirão para aperfeiçoar as ferramentas de predição. Pois, após a cristalografia da BVL-I eles serão analisados quanto sua veracidade de modo a aumentar sua confiabilidade.

5 REFERÊNCIAS

BATES, Paul; KELLEY, Lawrence; MACCALLUM, Robert; STERNBERG, Michael. Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 45, n. 5, p. 39-46, 2001.

DELBAERE, Louis; VANDONSELAAR, Margaret; PRASAD, Lata, QUAIL, Wilson; WILSON, Keith; DAUTER, Zbigniew. Structure of the Lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its Complex with the Lewis b Human Blood Group Determinant at 2.0 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, n. 3, p. 950-965, 1993.

ELGAVISH, Sharona; SHAANAN, Boaz. Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono- and disaccharides. **Journal of Molecular Biology**, v. 277, n. 4, p. 917-932, 1998.

HALL, Thomas. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n.41, p.95-98, 1999.

KIEFER, Florian; KONSTANTIN, Arnold; KÜNZLI Michael; BORDOLI Lorenza; SCHWEDE, Torsten. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. DB, p. 387-392, 2009.

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

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.