

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## BIOMEDICINA

## PREDIÇÃO COMPUTACIONAL DO EFEITO DE VINTE NOVOS NSSNPs DA SOD1 HUMANA NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

<sup>1</sup>Lorena Giannini Alves Moreira (IC-UNIRIO); <sup>1</sup>Joelma Freire de Mesquita (Orientador).

1 – Departamento de Genética e Biologia Molecular; Instituto Biomédico; Centro de Ciências Biológicas e da Saúde; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: UNIRIO, FAPERJ, CAPES

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica, nsSNPs, SOD1.

**INTRODUÇÃO**

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma desordem neurodegenerativa que afeta os neurônios motores causando perda progressiva e irregular da força muscular (ESCARRABILL et al., 2014). Ainda se sabe muito pouco sobre os fatores etiológicos de risco para ELA. Cerca de 10% de todos os casos apresentam um padrão claro de herança mendeliana (denominados como casos de ELA familiar – fELA) e o restante isolado na natureza são denominados como casos de ELA esporádica (UENAL et al., 2014). Um quarto dos casos de fELA são herdados devido a mutações no gene SOD1 que codifica a enzima Superóxido Dismutase 1 (SOD1), sendo essa última responsável pela eliminação de radicais livres (KIM et al., 2014). As mutações da SOD1 na fELA tem demonstrado diminuir a afinidade dos íons cobre/zinco e/ou a estabilidade de ligações dissulfeto (OGAWA; FURUKAWA, 2014). Vários métodos computacionais estão disponíveis para prever quando a mutação é relacionada à doença, a partir da sequência da proteína ou alinhamentos múltiplos de sequências de proteínas (CALABRESE et al., 2009). Além dos algoritmos para a predição, as ferramentas de modelagem e alinhamento molecular desempenham um importante papel na compreensão da patogênese ainda não completamente conhecida da ELA. Recentemente desenvolvemos um banco de dados da SOD1 - <http://bioinfogroup.com/database> - (MOREIRA et al., 2013) que contém os resultados da análise in silico de 126 variantes relacionadas a ELA. Após a publicação do artigo, vinte novas mutações da SOD1 foram descritas no banco de dados ALSOD e foram estudadas neste trabalho.

**OBJETIVO**

Avaliar os efeitos das mutações na estrutura e função das vinte novas variantes de SOD1 humana, utilizando métodos preditivos computacionais e de modelagem comparativa, bem como, atualizar o nosso banco de dados da proteína SOD1.

**METODOLOGIA**

Seguindo a metodologia já estabelecida em nosso grupo (DE CARVALHO; DE MESQUITA, 2013; MOREIRA et al., 2013), a análise in silico das 20 novas mutações da SOD1 realizada neste trabalho envolveu as seguintes etapas: Obtenção da Sequência Proteica – A sequência da SOD1 humana [UniProt: P00441] foi adquirida a partir do banco de dados UniProt (UNIPROT, 2014). Criação das Variantes Naturais da SOD1 obtidas do banco de dados ALSOD. Análise funcional das Sequências Mutantes – A partir da utilização de diferentes algoritmos: PolyPhen-2 (ADZHUBEI et al., 2010), SnpEff (DE BAETS et al., 2012), PhD-SNP (CAPRIOTTI; CALABRESE; CASADIO, 2006), PMUT (FERRER-COSTA; OROZCO; DE LA CRUZ, 2002), SIFT (NG; HENIKOFF, 2001), SNAP (BROMBERG; YACHDAV; ROST, 2008), SNPs&GO (CALABRESE et al., 2009) e nsSNPAnalyzer (BAO; ZHOU; CUI, 2005), I-Mutant (CAPRIOTTI; FARISELLI; CASADIO, 2005). Modelagem computacional das proteínas mutantes – Realizada através do workflow Mholine, que inclui os algoritmos Modeller e Procheck (CAPRIOTTI et al., 2010). Alinhamento estrutural das sequências mutantes com a SOD1 selvagem – Por meio do algoritmo TM-align (ZHANG; SKOLNICK, 2005). Atualização do Banco de Dados da SOD1 – Através da utilização de um server side include em Java, o JMOL. A base de dados no <http://bioinfogroup.com/database> contém todos os resultados obtidos neste trabalho, tendo sido os mesmos obtidos individual e manualmente em cada algoritmo citado.

**RESULTADOS**

De forma semelhante as 126 mutantes analisadas anteriormente, os resultados das análises das novas variantes descobertas demonstraram que a maioria delas foi classificada como sendo prejudicial à estrutura (Figura 1) e estabilidade da proteína em relação à SOD1 nativa. O algoritmo SNPs&GO foi o que obteve a maior acurácia de classificação de patogenicidade, classificando corretamente todas as mutantes como patológicas. Estas discrepâncias entre os resultados corroboram a necessidade de se usar diferentes algoritmos como descrito por Moreira, Carvalho, e colaboradores (DE CARVALHO; DE MESQUITA, 2013; MOREIRA et al., 2013). Além disso, quatro destas variantes foram classificadas como responsáveis por aumentar a tendência à agregação proteica (Lys3Glu, Ala4Phe, Arg115Cys e His120Leu), e a variante Pro66Arg foi classificada como responsável por diminuir a tendência de ligação a chaperonas. Os valores de RMSD abaixo de 2 Å definem a qualidade do modelo (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010), a maioria das mutações apresentou alterações em suas conformações tridimensionais, tendo os valores de RMSD do alinhamento estrutural variado entre 0,13 a 0,49 Å e os de TM-scores entre 0.99823 e 0.99923. Tendo em vista estes valores, é importante ressaltar que estruturas com alinhamentos cujos valores de RMSD sejam maiores do que 0.15 Å correspondem a perturbações estruturais significativas que podem ter implicações funcionais para a proteína (MISTRI et al., 2012).

### 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

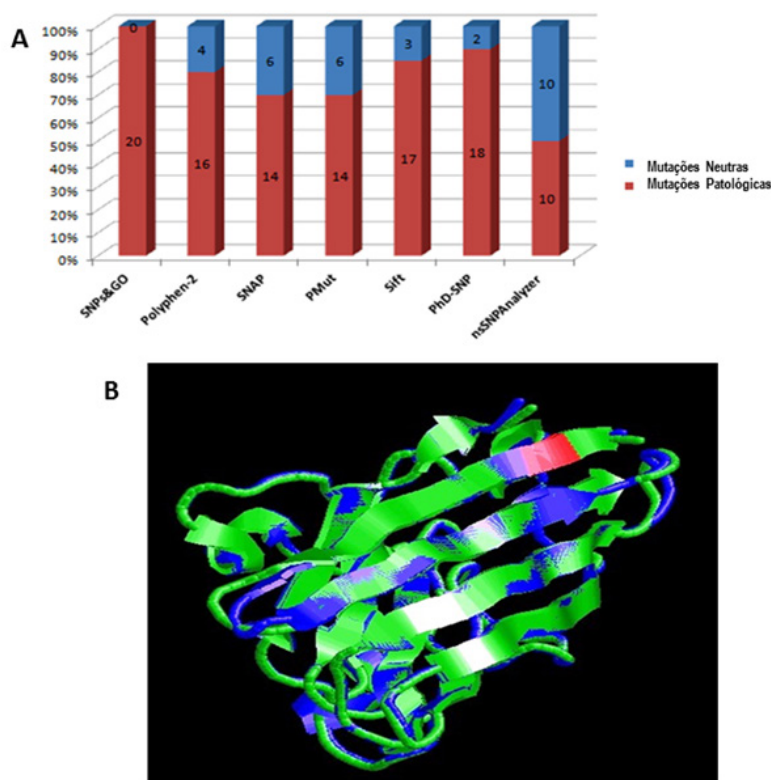


Figura 1 – A) Mutações classificadas como neutras e patogênicas pelos algoritmos de predição. As barras vermelhas mostram o número de mutações classificadas como responsáveis por causar a doença, enquanto as barras azuis mostram o número de mutações consideradas neutras por cada algoritmo. B) Alinhamento estrutural das estruturas nativa (verde) e mutante (azul) da SOD1 produzidas por modelagem comparativa. Em vermelho a mutação K3E.

#### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam a correlação existente entre as novas mutações da SOD1 e a fELA. O nosso banco de dados da SOD1 é o primeiro a convergir análises estruturais e funcionais da SOD1, e sua atualização com as variantes recentemente descritas é muito importante para uma melhor compreensão das bases moleculares da Esclerose Lateral Amiotrófica.

#### REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, v. 7, n. 4, p. 248-9, Apr 2010.
- BAO, L.; ZHOU, M.; CUI, Y. nsSNPAnalyzer: identifying disease-associated nonsynonymous single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. Web Server issue, p. W480-2, Jul 1 2005.
- BROMBERG, Y.; YACHDAV, G.; ROST, B. SNAP predicts effect of mutations on protein function. *Bioinformatics*, v. 24, n. 20, p. 2397-8, Oct 15 2008.
- CALABRESE, R. et al. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat*, v. 30, n. 8, p. 1237-44, Aug 2009.
- CAPRILES, P. V. et al. Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug targets for chagas' disease treatment. *BMC Genomics*, v. 11, p. 610, 2010.
- CAPRIOTTI, E.; CALABRESE, R.; CASADIO, R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics*, v. 22, n. 22, p. 2729-34, Nov 15 2006.
- CAPRIOTTI, E.; FARISELLI, P.; CASADIO, R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res*, v. 33, n. Web Server issue, p. W306-10, Jul 1 2005.
- DE BAETS, G. et al. SNPEff4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Res*, v. 40, n. Database issue, p. D935-9, Jan 2012.

### 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- DE CARVALHO, M. D.; DE MESQUITA, J. F. Structural modeling and in silico analysis of human superoxide dismutase 2. PLoS One, v. 8, n. 6, p. e65558, 2013.
- ESCARRABILL, J. et al. Place of death in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Rev Port Pneumol, Apr 28 2014.
- FERRER-COSTA, C.; OROZCO, M.; DE LA CRUZ, X. Characterization of disease-associated single amino acid polymorphisms in terms of sequence and structure properties. J Mol Biol, v. 315, n. 4, p. 771-86, Jan 25 2002.
- KIM, J. et al. Dimerization, oligomerization, and aggregation of human Amyotrophic lateral sclerosis Cu/Zn-superoxide dismutase 1 mutant forms in live cells. J Biol Chem, Apr 1 2014.
- MISTRI, M. et al. Identification of novel mutations in HEXA gene in children affected with Tay Sachs disease from India. PLoS One, v. 7, n. 6, p. e39122, 2012.
- MOREIRA, L. G. et al. Structural and functional analysis of human SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One, v. 8, n. 12, p. e81979, 2013.
- NG, P. C.; HENIKOFF, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. Genome Res, v. 11, n. 5, p. 863-74, May 2001.
- OGAWA, M.; FURUKAWA, Y. A seeded propagation of Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in amyotrophic lateral sclerosis. Front Cell Neurosci, v. 8, p. 83, 2014.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat Protoc, v. 5, n. 4, p. 725-38, Apr 2010.
- UENAL, H. et al. Incidence and Geographical Variation of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) in Southern Germany - Completeness of the ALS Registry Swabia. PLoS One, v. 9, n. 4, p. e93932, 2014.
- UNIPROT. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). Nucleic Acids Res, v. 42, n. 1, p. D191-8, Jan 1 2014.
- ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. Nucleic Acids Res, v. 33, n. 7, p. 2302-9, 2005.