

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## BIOMEDICINA

## PFN1 NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA – ANÁLISES IN SILICO E MODELAGEM COMPUTACIONAL

<sup>1</sup>Giovanni Henrique Almeida Silva Tellini (IC-FAPERJ); <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: FAPERJ, CAPES

Palavras Chaves: Esclerose Lateral Amiotrófica; Polimorfismos de Nucleotídeo Único; Profilina-1.

**INTRODUÇÃO**

A esclerose lateral amiotrófica (ALS, do inglês, “amyotrophic lateral sclerosis”) é uma desordem neurodegenerativa, progressiva e fatal, caracterizada pela perda seletiva de neurônios motores (HARDIMAN; VAN DEN BERG; KIERNAN, 2011). A diminuição de estímulos nervosos, decorrente desta perda, pode levar à atrofia muscular dos membros superiores e inferiores e da região torácica, que, por sua vez, pode evoluir à paralisia do trato respiratório levando os pacientes a óbito. A maioria dos casos de ALS se desenvolve de maneira esporádica, entretanto, a doença pode ser herdada geneticamente, caracterizando a esclerose lateral amiotrófica familiar (fALS, do inglês “familial amyotrophic lateral sclerosis”). Devido à alta complexidade na execução de pesquisas relacionadas à fALS, a descrição de sua incidência varia de 0,8 a 18% dos casos (ABEL et al., 2013). Recentemente, 5 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês “single nucleotide polymorphism”) do gene PFN1, foram associados ao desenvolvimento de fALS (INGRE et al., 2013; WU et al., 2012). Este gene codifica a profilina 1 (PFN1) [Uniprot ID: P07737], uma pequena proteína citosólica e ubíqua, responsável pelo controle da dinâmica dos filamentos de actina (THERIOT; MITCHISON, 1993). Além de se ligar diretamente à actina, a PFN1 interage com moléculas que contêm sequências ricas em prolina, como é o caso de várias proteínas reguladoras (TANAKA; SHIBATA, 1985) e com fosfatidilinosítois, principalmente com o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) (RUST; KULLMANN; WITKE, 2012). Uma vez que as causas de fALS ainda não foram completamente elucidadas, a busca por um tratamento eficaz, ainda inexistente (ZHAO et al., 2012), torna-se difícil, portanto, a compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da doença, é extremamente importante. Os métodos de bioinformática podem ser empregados para identificar e caracterizar regiões proteicas envolvidas no desenvolvimento de inúmeras doenças, guiando o desenho racional de fármacos, que facilita a criação de tratamentos eficazes (AGNATI et al., 2013). A bioinformática e biologia computacional podem ser utilizadas como ferramentas para caracterizar a estrutura e propriedades funcionais da PFN1 nativa e de suas formas mutadas, sugerindo vias que podem conduzir à agregação proteica (GUIDOLIN et al., 2012), formação de agregados insolúveis e outras alterações que contribuem com o desenvolvimento de fALS. Seguindo a metodologia estabelecida por nosso grupo (DE CARVALHO; DE MESQUITA, 2013; MOREIRA et al., 2013), neste trabalho foram utilizadas ferramentas de bioinformática e biologia computacional para criar modelos estruturais, tridimensionais, a partir das sequências dos SNPs da PFN1 e para estudar os mecanismos, através dos quais, cada mutação afeta a estrutura e funcionalidade da proteína.

**OBJETIVO**

Identificar possíveis alterações estruturais causadas por mutações na PFN1 humana, bem como inferir o comprometimento da estabilidade ou atividade proteica e sua relação com o desenvolvimento de ALS, além de criar um banco de dados, online e gratuito, com os resultados obtidos.

**METODOLOGIA**

Foi seguida a metodologia já estabelecida por nosso grupo (DE CARVALHO; DE MESQUITA, 2013; MOREIRA et al., 2013), os SNPs da PFN1 relacionados ao desenvolvimento de fALS foram coletados a partir de uma revisão bibliográfica e suas respectivas sequências foram criadas manualmente. As sequências mutadas foram submetidas a análises pelos seguintes algoritmos: I-Mutant, nsSNPAnalyzer, PhD-SNP, PMUT, PolyPhen-2, SAAP, Sift, SNAP, SNPs&GO e SNPeff. Em seguida, foi realizada uma análise filogenética estrutural, usando-se o servidor Consurf. Um modelo estrutural, tridimensional, foi criado para cada sequência, por modelagem ab initio, através do servidor I-TASSER (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010) e os servidores HHpred, M4T, ModWeb, Phyre2, Robetta e SwissModel, disponíveis no Protein Model Portal (ARNOLD et al., 2009), foram utilizados para a validação dos modelos, através de um alinhamento estrutural múltiplo realizado pelo servidor POSA (YE; GODZIK, 2005). O servidor TM-Align (ZHANG; SKOLNICK, 2005) foi utilizado para realizar alinhamentos estruturais entre a estrutura nativa da PFN1 e os modelos obtidos pelo I-TASSER. Todos os resultados obtidos estão sendo agrupados em um banco de dados.

**RESULTADOS**

Os resultados das análises de predição corroboram a relação, já descrita, entre os SNPs da PFN1 e as anormalidades funcionais que podem estar associadas ao desenvolvimento de fALS. De maneira geral, as mutações foram consideradas como não neutras pela maioria dos algoritmos e todas promoveram algum tipo de alteração na estabilidade da PFN1. A análise filogenética estrutural revelou que 4 dos 5 SNPs ocorrem em regiões bastante conservadas ao longo da evolução. Um modelo teórico foi criado para cada sequência submetida ao servidor I-TASSER e de acordo com os resultados do TM-Align o modelo criado com base na sequência nativa é topologicamente similar à estrutura da PFN1, determinada experimentalmente, enquanto os modelos das mutações revelaram alterações estruturais

### **13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

significantes, que podem contribuir com o surgimento de distúrbios funcionais da PFN1, que por sua vez, podem estar associados ao desenvolvimento de fALS. O alinhamento dos modelos, realizado através do servidor POSA apresentou um RMSD geral de 0.67Å, indicando que os modelos criados neste estudo são bem similares à estrutura da PFN1, já determinada por cristalografia de raio X. Os resultados obtidos estão sendo agrupados em um banco de dados, que será disponibilizado gratuitamente, para acesso online através do endereço: [www.bioinfogroup.com/database](http://www.bioinfogroup.com/database), para indivíduos das áreas médicas e biológicas possam explorar os nsSNPs da PFN1 e as alterações estruturais provocadas por cada mutação.

#### **CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos através da análise funcional dos SNPs e seu alinhamento com a estrutura nativa da PFN1 sugerem que tais mutações podem afetar a estrutura e, consequentemente, a estabilidade e funcionalidade da proteína, contribuindo com o desenvolvimento de fALS. Além disso, os SNPs descritos ocorrem em regiões da PFN1 conservadas ao longo da evolução, portanto, pode-se concluir que a ocorrência dessas mutações pode acarretar na alteração de regiões, cuja preservação é essencial à integridade funcional da PFN1. Levando em consideração a inexistência de um tratamento eficaz para a ALS, pode-se atribuir um caráter de bastante importância à continuidade de estudos sobre a relação entre SNPs da PFN1 e o desenvolvimento de fALS.

#### **REFERÊNCIAS**

- ABEL, O. et al. Credibility analysis of putative disease-causing genes using bioinformatics. *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e64899, 2013.
- AGNATI, L. F. et al. A new interpretative paradigm for Conformational Protein Diseases. *Curr Protein Pept Sci*, v. 14, n. 2, p. 141-60, Mar 2013.
- ARNOLD, K. et al. The Protein Model Portal. *J Struct Funct Genomics*, v. 10, n. 1, p. 1-8, Mar 2009.
- 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.
- GUIDOLIN, D. et al. Bioinformatics aggregation predictors in the study of protein conformational diseases of the human nervous system. *Electrophoresis*, v. 33, n. 24, p. 3669-79, Dec 2012.
- HARDIMAN, O.; VAN DEN BERG, L. H.; KIERNAN, M. C. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*, v. 7, n. 11, p. 639-49, Nov 2011.
- INGRE, C. et al. A novel phosphorylation site mutation in profilin 1 revealed in a large screen of US, Nordic, and German amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia cohorts. *Neurobiol Aging*, v. 34, n. 6, p. 1708 e1-6, Jun 2013.
- 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.
- 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.
- RUST, M. B.; KULLMANN, J. A.; WITKE, W. Role of the actin-binding protein profilin1 in radial migration and glial cell adhesion of granule neurons in the cerebellum. *Cell Adh Migr*, v. 6, n. 1, p. 13-7, Jan-Feb 2012.
- TANAKA, M.; SHIBATA, H. Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem*, v. 151, n. 2, p. 291-7, Sep 2 1985.
- THERIOT, J. A.; MITCHISON, T. J. The three faces of profilin. *Cell*, v. 75, n. 5, p. 835-8, Dec 3 1993.
- WU, C. H. et al. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, v. 488, n. 7412, p. 499-503, Aug 23 2012.
- YE, Y.; GODZIK, A. Multiple flexible structure alignment using partial order graphs. *Bioinformatics*, v. 21, n. 10, p. 2362-9, May 15 2005.
- 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.
- ZHAO, W. et al. Caprylic triglyceride as a novel therapeutic approach to effectively improve the performance and attenuate the symptoms due to the motor neuron loss in ALS disease. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e49191, 2012.