

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## BIOMEDICINA

## ANÁLISES IN SILICO DA PROTEÍNA FUS HUMANA NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAL DO TIPO 6

<sup>1</sup> Juliana Pereira Loureiro (IC-UNIRIO); <sup>1</sup> Joelma Freire De Mesquita (Orientadora)

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, CAPES

Palavras-chave: FUS, ELA, SNP.

**INTRODUÇÃO**

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa de início na idade adulta caracterizada por paralisia rapidamente progressiva e morte por insuficiência respiratória, geralmente dentro de 2 a 3 anos do início dos sintomas. Como em outras doenças neurodegenerativas, ~10% da ELA são classificadas como familiar (ELAF), ao passo que os restantes 90% dos casos são considerados esporádicos, como eles parecem ocorrer aleatoriamente na população (RENTON; CHIO; TRAYNOR, 2014). A proteína FUS foi recentemente correlacionada a casos de esclerose lateral amiotrófica familiar tipo 6 (ODA; IZUMI; KAJI, 2011). O gene FUS codifica uma proteína que compõem o complexo de proteínas ribonucleicas heterogêneas, pertencentes à família FET RNA ligantes, que tem função de regulação na expressão gênica e manutenção da integridade genômica do DNA, além do processamento de RNAm e de pré-RNAm e na sua migração para o citoplasma (VANCE et al., 2009). Concentrada predominantemente no núcleo, possui aproximadamente 75 kDa e é codificada pelo gene FUS no cromossomo 16p11.2. Na esclerose lateral amiotrófica familiar 4% é resultado de mutação na FUS (TICOZZI et al., 2011). 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 FUS e para estudar os mecanismos, através dos quais, cada mutação afeta a estrutura e funcionalidade da proteína.

**OBJETIVO**

Identificar possíveis alterações estruturais causadas pelas mutações na FUS e relaciona-las a estabilidade, capacidade de agregação da proteína. Determinar se tais mutações comprometem a estabilidade ou a atividade da proteína por predições dos efeitos funcionais, relacionando-as ao desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica tipo 6.

**METODOLOGIA**

Compilação dos polimorfismos não sinônimos (nsSNP) da FUS descritas na literatura, com as sequências mutadas foram feitas análises pelos algoritmos nsSNP Analyzer (BAO; ZHOU; CUI, 2005), PhD-SNP, Pmut (FERRER-COSTA et al., 2005), Polyphen-2, Sift (FLANAGAN; PATCH; ELLARD, 2010), SNAP (BROMBERG; ROST, 2007), SNPs&GO, SNPeffect e I-mutant (CAPRIOTTI; FARISELLI; CASADIO, 2005) para compreensão da estabilidade e atividade proteica. A análise filogenética das sequências da proteína FUS humana e de outros organismos foi feita para comparação de regiões conservadas da proteína, com o algoritmo Consurf. (GLASER et al., 2003). A estrutura tridimensional da FUS nativa e suas variantes foram determinadas por modelagem computacional ab initio com os algoritmos I-TASSER (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010) e Rosetta, e modelagem comparativa com os algoritmos Modeller (ESWAR et al., 2007) e RosettaCM. Com os modelos gerados foi feito um alinhamento estrutural de cada variante e da nativa pelo algoritmo TM-align.

**RESULTADOS**

De trinta e seis variantes estudadas, todas foram classificadas como neutras pelo SNPs&GO e patológicas no Sift. Apenas uma variante aumentou a propensão amiloide de acordo com o SNPeffect. Nos demais algoritmos as classificações entre neutras e patológicas foi equilibrada. Observamos que a maioria das variantes classificadas como patológicas obtiveram essa classificação em quatro diferentes algoritmos. Quanto à estabilidade proteica a análise do FOLDX classificou a maioria das variações como neutras, enquanto que o I-mutant classificou como redutoras de estabilidade. Estas discrepâncias entre os resultados corroboram a necessidade de se usar diferentes algoritmos como descrito por Moreira e colaboradores (MOREIRA et al., 2013). A filogenia estrutural foi analisada utilizando-se o ConSurf, e revelou que a FUS humana é altamente conservada, principalmente nas regiões em que mutações causam a doença sugerindo que a ELA atue como pressão seletiva na conservação (DE CARVALHO; DE MESQUITA, 2013). Os valores de RMSD abaixo de 2 Å definem a qualidade do modelo (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010), a modelagem estrutural (figura 1.a) gerou modelos de qualidade com RMSDs entre 1,02 e 1,66 Å no alinhamento estrutural (figura 1.b). Um banco de dados curado foi desenvolvido com os resultados e permitirá que profissionais da área de saúde explorem os nsSNPs da FUS, incluindo todas as análises como a predição das consequências das variações e a visualização do alinhamento dos modelos estruturais naturais com os mutantes.

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

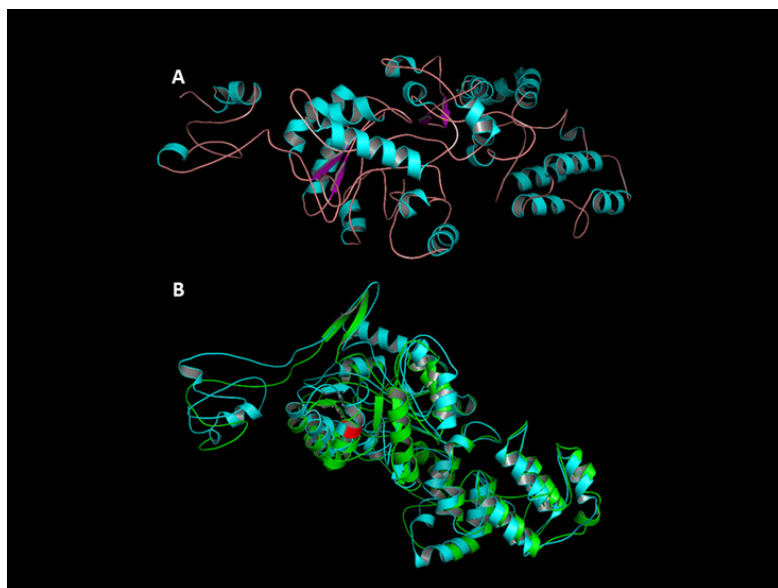


Figura 1: (a) Modelo estrutural da proteína FUS nativa gerada no ITASSER (b) Alinhamento estrutural pelo TM-align da FUS nativa (azul) com a variante N159Y (verde). Em vermelho a mutação.

### CONCLUSÃO

Os resultados confirmaram os efeitos dos nsSNP na estrutura da proteína FUS. A predição funcional e estrutural demonstrou a necessidade de se usar mais de um algoritmo de predição para ter resultados confiáveis. Os resultados foram compilados em um banco de dados da FUS gratuito e disponível em <http://bioinfogroup.com/database/>.

### REFERÊNCIAS

- 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.; ROST, B. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res*, v. 35, n. 11, p. 3823-35, 2007.
- 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 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.
- ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci*, v. Chapter 2, p. Unit 2 9, Nov 2007.
- FERRER-COSTA, C. et al. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics*, v. 21, n. 14, p. 3176-8, Jul 15 2005.
- FLANAGAN, S. E.; PATCH, A. M.; ELLARD, S. Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genet Test Mol Biomarkers*, v. 14, n. 4, p. 533-7, Aug 2010.
- GLASER, F. et al. ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics*, v. 19, n. 1, p. 163-4, Jan 2003.
- 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.
- ODA, M.; IZUMI, Y.; KAJI, R. [Gene mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis]. *Brain Nerve*, v. 63, n. 2, p. 165-70, Feb 2011.
- RENTON, A. E.; CHIO, A.; TRAYNOR, B. J. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci*, v. 17, n. 1, p. 17-23, Jan 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.
- TICOZZI, N. et al. Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol*, v. 149, n. 1, p. 65-82, Mar 2011.
- VANCE, C. et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, v. 323, n. 5918, p. 1208-11, Feb 27 2009.