

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

ANÁLISES IN SILICO DA TDP-43 (TARDP) NA ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAL

¹ Silvestre, V.A (IC-UNIRIO); ¹ De Mesquita J.F. (Orientadora)

1 - Departamento de Genética e Biologia Molecular; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: UNIRIO, CAPES

Palavras chaves: nsSNP, Esclerose Lateral Amiotrófica, TDP-43.

INTRODUÇÃO

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) tem sido um grande mistério para a ciência. Relatada como a perda progressiva de neurônios motores superiores e inferiores, a ELA conduz a uma paralisia e posteriormente morte do indivíduo. De início tardio, a ELA apresenta idade típica de início entre 50 e 60 anos de idade e incidência global de 1-2 casos por 100.000 indivíduos por ano (TICOZZI et al., 2011). Como a causa da ELA é ainda desconhecida, não existe atualmente nenhum tratamento efetivo, e por isso a cura ainda não pode ser alcançada. Recentes estudos revelam um processamento de RNA alterado na patogênese, com mutações em proteínas de ligação ao RNA, como a TDP-43, que sofre mutações ao se agregar para forma de inclusões intracelulares (GITLER, 2012). Além da TDP-43, a ELA também está associada a mutações na Superóxido Dismutase 1 (SOD1), FUS e, em menores porcentagens, defeitos nas vias de RNA. Neumann e colaboradores (NEUMANN et al., 2006) identificaram uma proteína de 43-kDa, denominada TDP-43, como o principal componente de mutações causadoras da ELA. Em agregados, a TDP-43 é hiperfosforilada e clivada gerando fragmentos anormais nas extremidades C-terminais. Além disso, em neurônios afetados, a TDP-43 se distribui pelo núcleo da célula. O que sugere uma redistribuição celular da proteína em suas diferentes formas. Com estas observações, leva-se a associação do papel patogênico da TDP-43 nos casos da ELA. Recentes estudos reforçam o papel da TDP-43 como causa de mutações causadoras da ELA. Em relatos, foram achados acúmulos citoplasmáticos de agregados de TDP-43 em neurônios em degeneração na maioria das pessoas com a doença (ARMAKOLA et al., 2012). Em virtude disso, estudos com a TDP-43 têm sido realizados para definir os mecanismos pelos quais a TDP-43 contribui para a ELA, visando assim decifrar detalhadamente o papel da proteína na patogênese e poder um dia se obter a cura da mesma.

OBJETIVO

Identificar possíveis alterações estruturais causadas pelas mutações na TDP-43 bem como determinar se tais mutações comprometem a estabilidade ou a atividade da proteína por predições computacionais in silico dos efeitos funcionais.

METODOLOGIA

Seguindo a metodologia já desenvolvida em nosso grupo (DE CARVALHO; DE MESQUITA, 2013; MOREIRA et al., 2013) primeiramente realizou-se a compilação das mutações na proteína TDP-43 descritas na literatura utilizando os bancos de dados OMIM, UNIPROT e ALSod. Com as mutações obtidas foi realizada a análise de polimorfismos não sinônimos (nsSNP) na TDP-43, permitindo identificar se tais mutações comprometem a estabilidade ou a atividade da proteína por predições dos efeitos funcionais usando estruturas tridimensionais de proteínas como guia. Para tanto foram utilizados algoritmos como o nsSNP Analyzer, PhD-SNP, PMUT, PolyPhen-2 Sift, SNAP, SNPs&GO, TANGO, WALTZ, LIMBO, FoldX e PolyPhen (MOREIRA et al., 2013). Para predição das estruturas proteicas da TDP-43 nativa e mutantes foram realizadas as modelagens computacionais comparativa e ab initio da estrutura tridimensional das variantes de TDP-43, sendo utilizadas as coordenadas da estrutura tridimensional determinadas experimentalmente por cristalografia de raios-X ou ressonância magnética nuclear e com isso correlacionar as possíveis mudanças estruturais causadas pelas mutações e a atividade biológica. Sendo assim os modelos estruturais teóricos das sequências proteicas foram criados por modelagem comparativa utilizando algoritmos como o MODELLER (ESWAR et al., 2008) e validados pelo algoritmo PROCHECK (CAPRILES et al., 2010; LASKOWSKI et al., 1993). Para investigar a similaridade estrutural foram utilizados algoritmos de alinhamento tridimensional, como o TM-align (ZHANG; SKOLNICK, 2005). A análise filogenética estrutural das sequências da proteína TDP-43 humana e de outros organismos foi determinada pelo algoritmo Consurf (ASHKENAZY et al., 2010).

RESULTADOS

A compilação das mutações resultou num total de 41 mutantes da TDP-43 relacionadas com a Esclerose Lateral Amiotrófica. A análise dos nsSNP da TDP-43 revelou comprometimento por pelo menos uma mutação para a maioria dos algoritmos utilizados, o número de mutações classificadas como danosas por algoritmo utilizado está representado na figura 1A. Alguns algoritmos obtiveram mais resultados danosos do que outros, como no caso do PMUT com 21 mutações consideradas prejudiciais e o SNPs&GO que teve como resultado danoso apenas uma mutação. Já o algoritmo SNPeffect que avalia o impacto da mutação sobre quatro parâmetros, revelou que através do TANGO nenhuma mutação possui regiões propensas à agregação; segundo o WALTZ apenas uma mutação diminui regiões formadoras de amiloide; com o LIMBO nenhuma mutação predisse locais de ligação chaperona; o FoldX não obteve resultado sobre o efeito na estabilidade da estrutura proteica. Já com a modelagem computacional comparativa e ab initio pôde-se obter modelos tridimensionais das 41 mutações estudadas. As figuras 1B e 1C ilustram os modelos estruturais da TDP43 nativa e da mutante A90V obtida através de modelagem ab initio pelo programa I-Tasser. A partir das estruturas geradas e realização do

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

alinhamento estrutural das formas mutantes com a forma nativa da TDP-43 obtiveram-se os valores de RMSD e TM-score na média de 3,17 e 0,68745 respectivamente, revelando a distância da forma mutante para a nativa. A análise filogenética estrutural revelou que a proteína TDP-43 é fortemente conservada. Os resultados foram compilados em um amplo banco de dados de nsSNP da TDP-43 disponível em <http://bioinfogroup.com/database/>

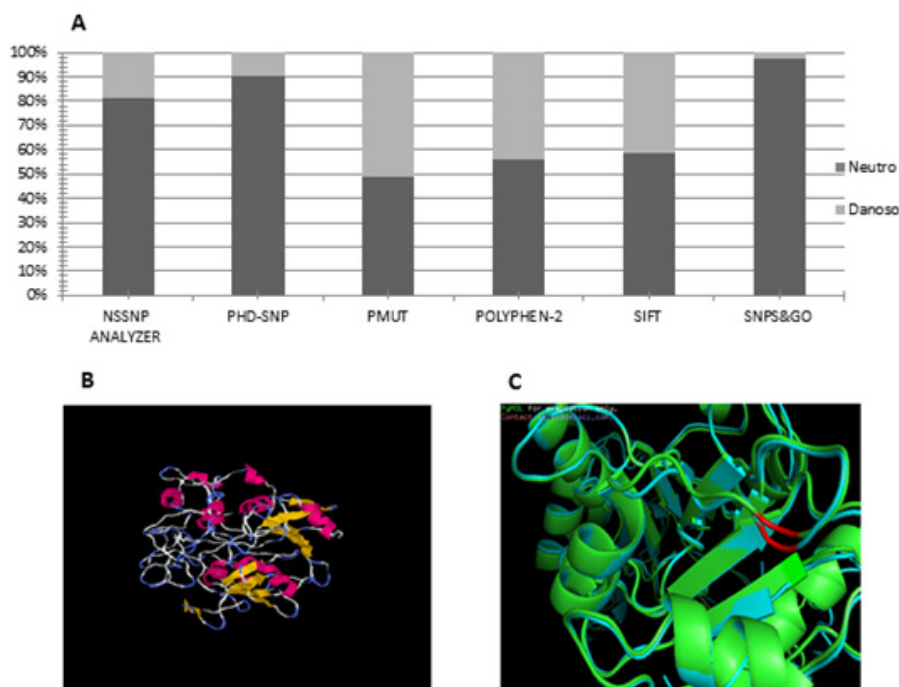


Figura 1 - A) Percentual de resultados neutros e danosos dos nsSNPs da TDP-43 segundo os algoritmos de predição de SNP. B) Visão geral do modelo teórico da TDP-43 nativa. C) Alinhamento estrutural da estrutura nativa (verde) e mutante (azul), em vermelho a mutação G290A.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que as mutações da proteína TDP-43 afetam a estrutura da proteína, corroborando as associações com a ELA. É fundamental a utilização de diversos algoritmos de predição de SNP já que foram observadas disparidades entre os resultados dos algoritmos utilizados e, portanto a utilização de mais de um algoritmo minimiza possíveis falsos negativos.

REFERÊNCIAS

- ARMAKOLA, M. et al. Inhibition of RNA lariat debranching enzyme suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models. *Nat Genet*, Oct 28 2012.
- ASHKENAZY, H. et al. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, v. 38, n. Web Server issue, p. W529-33, Jul 2010.
- 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.
- 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. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*, v. 426, p. 145-59, 2008.
- GITLER, A. D. TDP-43 and FUS/TLS yield a target-rich haul in ALS. *Nat Neurosci*, v. 15, n. 11, p. 1467-9, Nov 2012.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
- 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.
- NEUMANN, M. et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, v. 314, n. 5796, p. 130-3, Oct 6 2006.
- TICOZZI, N. et al. Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol*, v. 149, n. 1, p. 65-82, Mar 2011.
- 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.