

ANÁLISE ESTRUTURAL DE MUTAÇÕES NO GENE F8 EM PACIENTES COM HEMOFILIA A

Lara Hochscheid Stelmach, Francisco M. Salzano

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética

INTRODUÇÃO

A Hemofilia A (HA) é um distúrbio hemorrágico causado pela deficiência do fator VIII da coagulação (FVIII), resultante de alterações no gene F8 que codifica essa proteína. Vários tipos de mutações já foram descritas no gene F8 como causadoras de HA. Devido à grande heterogeneidade clínica da doença e à variedade de mutações encontradas, estudos para o melhor entendimento acerca da estrutura e função do FVIII se tornam essenciais.

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo analisar e correlacionar diferenças estruturais e funcionais em mutações de sentido trocado previamente identificadas em pacientes com hemofilia A no Rio Grande do Sul, estabelecendo a relação genótipo-fenótipo para cada caso.

METODOLOGIA

No estudo foram analisadas 12 mutações de sentido trocado localizadas na cadeia leve do FVIII, identificadas em estudos anteriores. Com o intuito de avaliar a patogenicidade das substituições, foram verificados bancos mundiais de variantes (1000 genome browser e UCSC genome Browser) e realizadas previsões de dano em cinco algoritmos: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), Mutation Taster, PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer), SIFT (Sorting Intolerant to Tolerant) e HOPE (Have yOur Protein Explained). Modelos estruturais para a sequência selvagem e para cada uma das mutações estudadas foram gerados no programa Phyre-2 (Expert Mode—one to one Threading), através de modelagem por homologia baseada na estrutura 4BDV obtida no PDB (Protein Data Bank). O potencial eletrostático (PE) foi calculado para cada uma das estruturas com a ferramenta DelPhi Web Server. O programa webPIPSA (Protein Interaction Property Similarity Analysis) foi utilizado para realizar a clusterização das estruturas a partir de suas similaridades eletrostáticas. As informações obtidas do PIPSA foram comparadas com os dados de potencial eletrostático gerados para cada mutação na ferramenta Delphi, através de uma análise visual com a implementação da interface Chimera.

REFERÊNCIAS:

- ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, v. Chapter 7, p. Unit7.20, Jan 2013. ISSN 1934-8258.
- GORZIZA, R. P. et al. Genetic changes in severe haemophilia A: new contribution to the aetiology of a complex disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, v. 24, n. 2, p. 164-9, Mar 2013. ISSN 1473-5733.
- KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, v. 10, n. 6, p. 845-58, Jun 2015. ISSN 1750-2799.
- KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, v. 4, n. 7, p. 1073-81, 2009. ISSN 1750-2799.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, v. 25, n. 13, p. 1605-12, Oct 2004. ISSN 0192-8651.
- RICHTER, S. et al. webPIPSA: a web server for the comparison of protein interaction properties. *Nucleic Acids Res*, v. 36, n. Web Server issue, p. W276-80, Jul 2008. ISSN 1362-4962.
- ROSSET, C. et al. Detection of new mutations and molecular pathology of mild and moderate haemophilia A patients from southern Brazil. *Haemophilia*, v. 19, n. 5, p. 773-81, Sep 2013. ISSN 1365-2516.
- SCHWARZ, J. M. et al. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*, v. 7, n. 8, p. 575-6, Aug 2010. ISSN 1548-7105.
- SMITH, N. et al. DelPhi web server v2: incorporating atomic-style geometrical figures into the computational protocol. *Bioinformatics*, v. 28, n. 12, p. 1655-7, Jun 2012. ISSN 1367-4811.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível identificar alterações eletrostáticas na superfície de 9 das 12 mutações (75%) de sentido trocado analisadas. A substituição de aminoácidos nessas estruturas ocasionou um afastamento dos modelos estruturais gerados da proteína selvagem, enquanto que as estruturas onde não houve alterações no potencial eletrostático (25%) foram agrupadas com a estrutura selvagem.

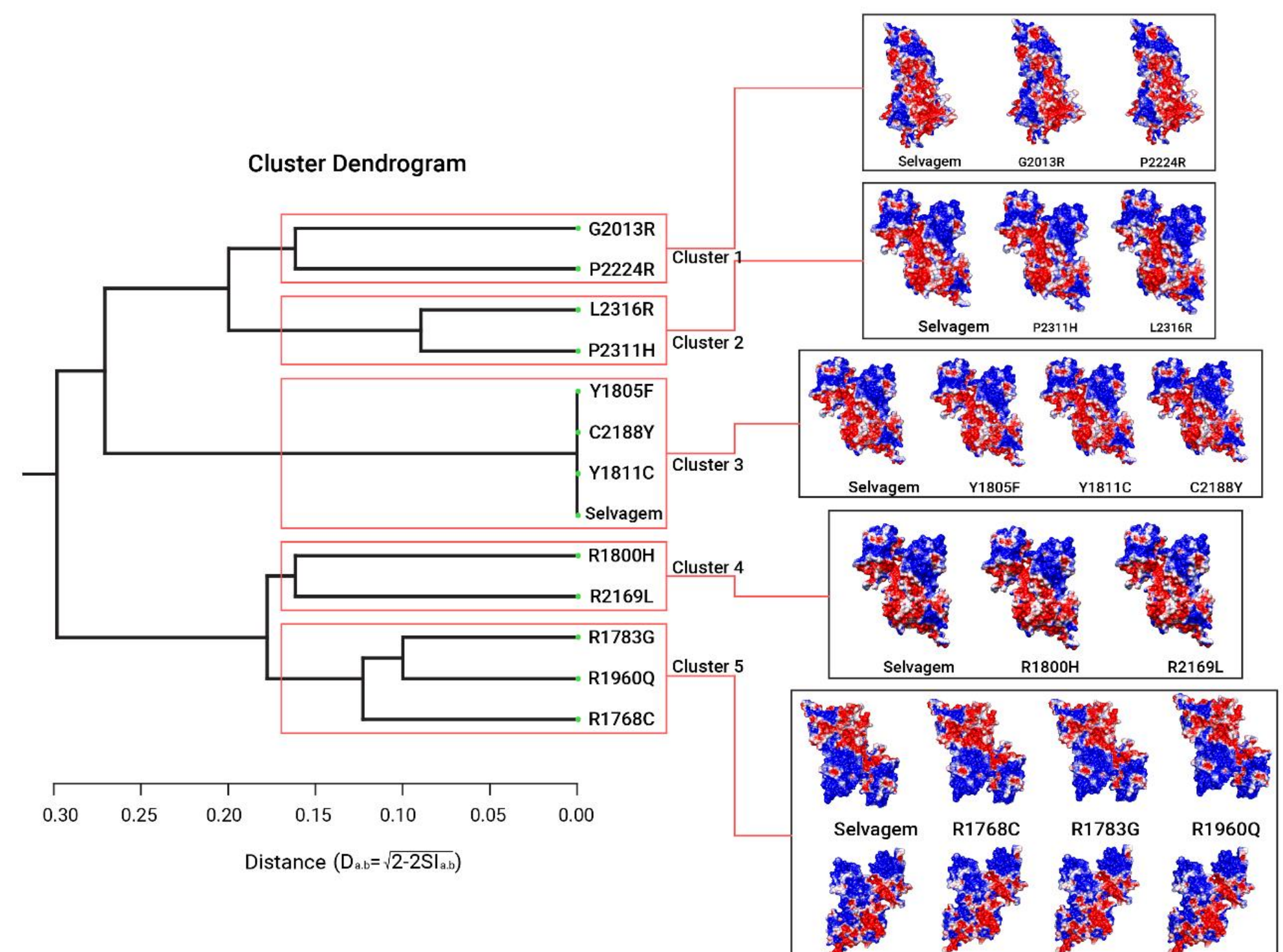


Figura 1. Análise das estruturas conforme similaridades eletrostáticas. A clusterização gerada no programa webPIPSA reuniu as estruturas em cinco clusters conforme o epograma à esquerda. As imagens à direita correspondem à distribuição eletrostática verificada para as estruturas mutadas e selvagem a partir da ferramenta Delphi implementada na interface Chimera. As regiões mostradas em azul, branco e vermelho, são, respectivamente, eletropositivas, neutras e eletronegativas.

Verificamos também que muitos modelos apresentaram alterações nas ligações de hidrogênio e/ou modificações em sua hidrofobicidade. Além disso, a troca de aminoácidos resultou na perda de uma ponte dissulfeto em uma das mutações do estudo. As diferenças estruturais observadas a partir das substituições de aminoácidos modificam propriedades importantes para a função do FVIII, podendo contribuir para o fenótipo encontrado nos pacientes com hemofilia A.

CONCLUSÕES

A partir desse estudo foi possível demonstrar que tais modificações interferem na estabilidade, nas ligações e no dobramento da cadeia, o que pode alterar a afinidade com outras estruturas. Porém, não fica esclarecido o quanto cada alteração contribui para o fenótipo dos pacientes, para tal seriam necessários mais estudos envolvendo os efeitos dessas modificações nas interações físico-químicas da proteína.