

Desenvolvimento de uma abordagem estrutural para predição de efeitos de mutações pontuais de um único aminoácido

Aluno: Leonardo Alves Santos¹; Orientador: Márcio Dorn²
¹ Instituto de Biociências UFRGS; ² Instituto de Informática UFRGS

INTRODUÇÃO

Mutações pontuais de nucleotídeos são comumente encontrados ao longo de genomas, estas mutações podem acarretar em mudanças na sequência de aminoácidos codificados pelo DNA mutado, causando mutações de um único nucleotídeo (SNPs). Estes polimorfismos, quando ocorrem em regiões codificadoras, podem ser classificados em dois tipos: não-sinônimos (nsSNP), quando há troca de aminoácido, e sinônimos, quando não há troca de aminoácido em decorrência da mutação.

Compreender e prever estes os efeitos de um SNPs é de extrema importância, uma vez que, sabe-se que são causadores diretas ou indiretas de patologias, assim como sua utilidade para a biotecnologia, pelo uso como marcadores genéticos. A identificação de SNPs é feita de duas maneiras principais, experimentalmente, uma metodologia trabalhosa e cara, e com o uso de ferramentas de bioinformática.

Os preditores existentes de efeitos de SNPs utilizam diversos parâmetros para prever estes efeitos, por exemplo, homologia de sequências, propriedades bioquímicas de resíduos de aminoácidos, entre outras, porém poucos usam informações da estrutura secundária. A estrutura secundária descreve a disposição espacial do esqueleto peptídico do aminoácido, esta organização espacial possui algumas conformações mais recorrentes, as hélices alfa e as folhas beta, assim como regiões sem uma conformação definida, as regiões de voltas (coils).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é propor uma nova abordagem para predição de possíveis efeitos decorrentes de nsSNPs utilizando dados estruturais de padrões tridimensionais já depositados no RCSB PDB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente uma busca por proteínas foi realizada no banco de dados do Swiss-Prot, um banco de dados de proteínas que contém informações funcionais e estruturais, incluindo mutações de um único aminoácido e seus efeitos. As proteínas selecionadas foram:

- Kappa-conotoxin PVIIA: uma toxina de organismos do gênero *Conus* que inibem canais de potássio;
- Cytosolic phospholipase A2: uma hidrolase responsável pela hidrólise de fosfolípidios na iniciação de resposta inflamatória. A mutação escolhida foi na posição 200 R>A,H,K; onde A e H reduzem 100% da atividade da proteína, enquanto K reduz parcialmente.

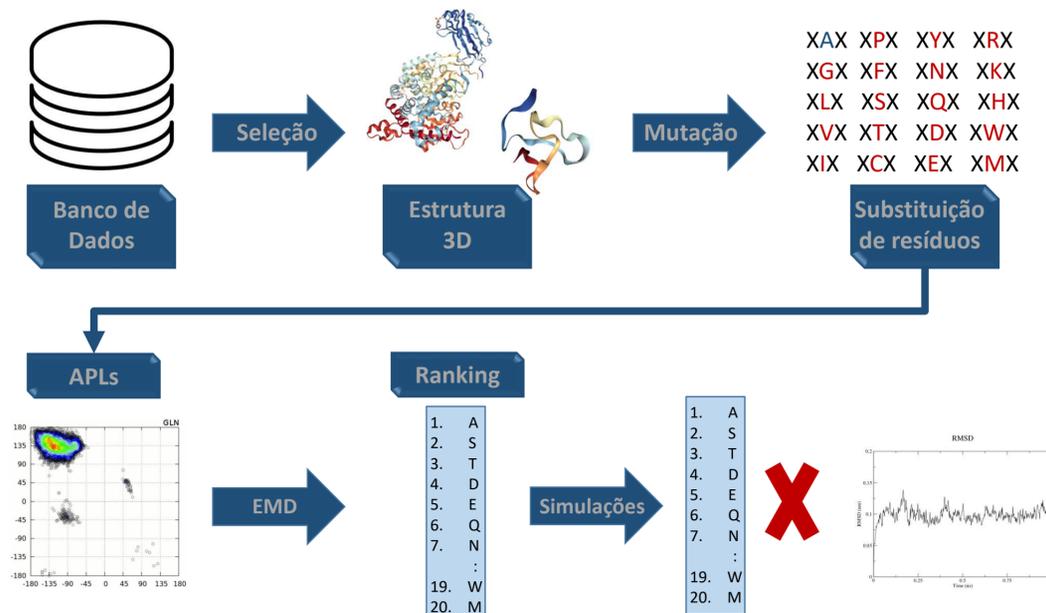
As estruturas 3-dimensionais destas proteínas foram obtidas no RCSB PDB.

→ Mutações:

Uma mutação para a toxina e outra para a hidrolase foram selecionadas para serem testadas, porém ambas são responsáveis pela perda total das atividades da proteína. Após a seleção, os aminoácidos nativos foram substituídos pelos outros 20 aminoácidos para que fosse possível calcular as Angle Probability Lists (APLs). este cálculo foi realizado para 3 casos, apenas o aminoácido, para o aminoácido mais seus vizinhos (esquerda ou direita) e para os três aminoácidos, o mutado e seus dois vizinhos.

A análise dos resultados e ranqueamento de possíveis efeitos na proteína foi realizada utilizando-se o método Earth Mover's Distance (EMD), um algoritmo que calcula a distância de duas distribuições de probabilidades em uma certa região.

Contudo, as APLs não foram suficientes para a predição de efeito de mutações pontuais de aminoácidos, portanto dinâmicas moleculares foram realizadas para que houvesse um cruzamento entre os resultados obtidos pelo ranqueamento das APLs e informações das simulações, de forma que as melhores ranqueadas possuíssem um comportamento estrutural semelhante aos da proteína não-mutada.



RESULTADOS

O método foi eficiente na predição de efeitos de mutações pontuais, como mostra a Figura 1, pois classificou a Lisina como menos danosa, enquanto que a Histidina e Alanina possuíram uma colocação pior. Contudo as dinâmicas moleculares não se mostraram adequadas para serem utilizadas como parâmetro de validação.

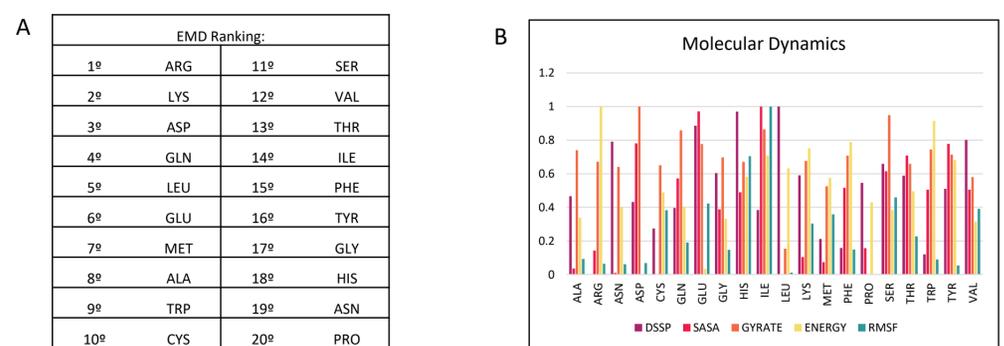


FIGURA 1. (A) Ranqueamento do método proposto para as substituições de um único aminoácido para a mutação R200AHK; (B) no gráfico estão plotados os valores médio obtidos da dinâmica molecular de 50ns: DSSP: resíduos em α-Hélice; SASA: Área de Superfície Acessível ao Solvente; GYRATE: Raio de Giro; ENERGY: Energia Total; RMSF: Flutuação Atômica de todos os resíduos

CONCLUSÃO

O método proposto mostra-se capaz de prever efeitos de SNPs com base na comparação de dados depositados em bancos de dados, assim como o EMD mostrou-se adequado para o ranqueamento. Contudo as dinâmicas moleculares, apesar de serem ótimas ferramentas para análises estruturais, não foram capazes de correlacionar efeitos de SNPs. A adição dos aminoácidos da vizinhança do aminoácido mutado, afim de aumentar a capacidade de predição, assim como novos protocolos de validação, uma vez que as dinâmicas moleculares não foram compatíveis, estão sendo estudadas para serem implementados na ferramenta.

AGRADECIMENTOS