

# Análise estrutural de mutações do gene F9 em pacientes com Hemofilia B.

Lara Hochscheid Stelmach, Francisco M. Salzano  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética

## INTRODUÇÃO

A Hemofilia B é uma doença hemorrágica causada pela redução da atividade do Fator IX (FIX) devido à mutações no gene F9, que codifica esta proteína. O padrão de herança é recessivo ligado ao cromossomo X. O gene F9 está localizado no cromossomo Xq27.1, sendo composto por 8 éxons. Os pacientes afetados podem ser classificados em graves, moderados e leves, de acordo com as características clínicas apresentadas e a quantidade de FIX produzida. São considerados casos graves aqueles em que a atividade do FIX é <1%, moderados quando apresentam atividade entre 1 e 5%, e leves quando a atividade do FIX está entre 5 e 40%. O tratamento é realizado pela reposição de FIX, purificado de plasma ou obtido por técnicas de DNA recombinante.

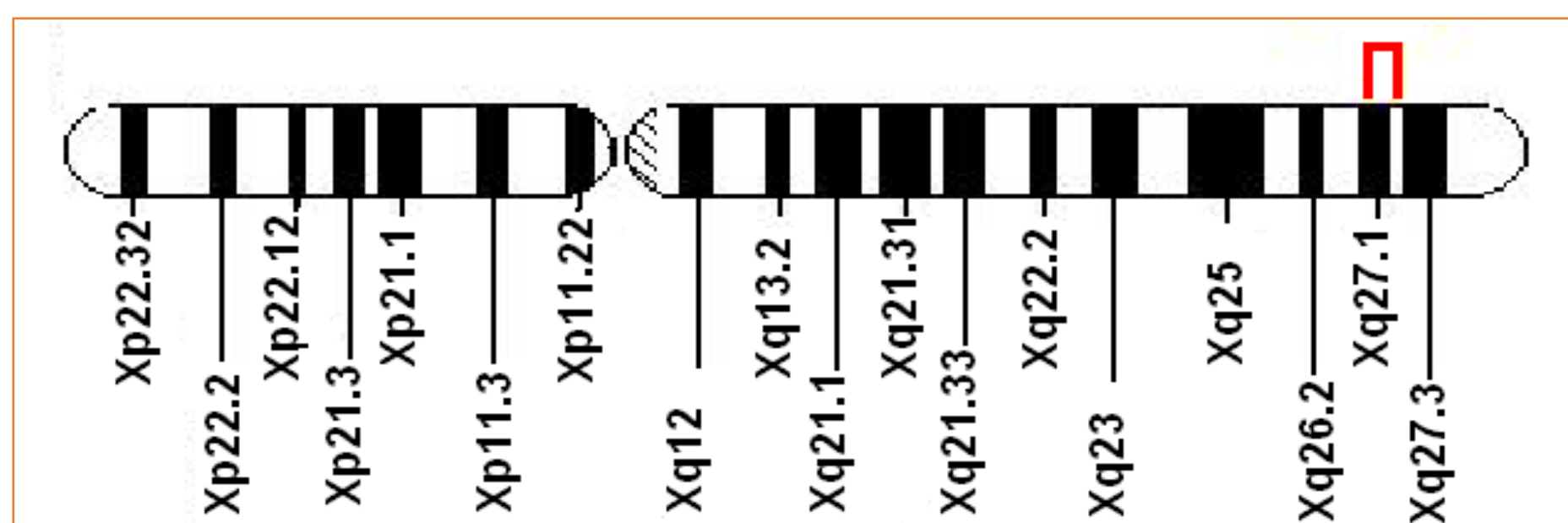


Figura 1: Localização do gene F9 no cromossomo Xq27.1.

## OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é analisar e correlacionar as diferenças estruturais e funcionais encontradas em três mutações de sentido trocado previamente identificadas: p.Arg43Trp (c.127C>T); p.Phe55Cys (c.164T>G); p.His302Arg (c.905A>G).

## MATERIAIS E MÉTODOS

A predição do efeito das mutações foi efetuada pelos programas PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2-<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e HOPE (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>). O alinhamento com as sequências do FIX de outras espécies foi realizado utilizando o programa PolyPhen-2 e a ferramenta BLAST do Uniprot. Foi utilizado o programa Phyre-2 (Expert Mode - one to one Threading-<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) para gerar modelos de estruturas correspondentes as mutações Phe55Cys e His302Arg, tomando como base estruturas obtidas no PDB (Protein Data Bank). Os potenciais eletrostáticos foram calculados para estas estruturas com a ferramenta DelPhi ([http://compbio.clemson.edu/sapp/delphi\\_webserver/](http://compbio.clemson.edu/sapp/delphi_webserver/)). Os arquivos e potencial eletrostático foram visualizados no programa Chimera.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das predições efetuadas pelo programa PolyPhen-2 os escores de dano verificados para as mutações p.Arg43Trp e p.His302Arg foram 1.00 (valor máximo) e 0,995 para a mutação Phe55Cys. Utilizando o software HOPE foi possível identificar que as três mutações ocorrem em regiões de grande conservação de aminoácidos, corroborando com os altos escores de dano obtidos. Além disso, a mutação Arg43Trp ocorre no domínio proteico do pró-peptídeo. Já a Phe55Cys é uma variante que está localizada no domínio GLA. O pró-peptídeo juntamente com o domínio GLA forma o sítio de reconhecimento da  $\gamma$ -carboxilase, uma enzima dependente de vitamina K, responsável pela modificação pós-traducional dos 12 primeiros resíduos de ácido glutâmico. O domínio GLA também serve como substrato para a  $\gamma$ -carboxilação e para ligação com fosfolípidos plaquetários, etapa importante na coagulação sanguínea. A alteração His302Arg localiza-se no domínio catalítico, que está presente no peptídeo maduro. Resíduos nesse domínio provavelmente contribuem para a interação com outros fatores da coagulação. Com base nos modelos estruturais obtidos no PDB, foi possível gerar no servidor phyre-2 estruturas para as mutações Phe55Cys e His302Arg, não foi possível gerar um modelo para a mutação Arg43Trp pois está localizada no pró-peptídeo do gene, o qual não está presente na proteína madura.

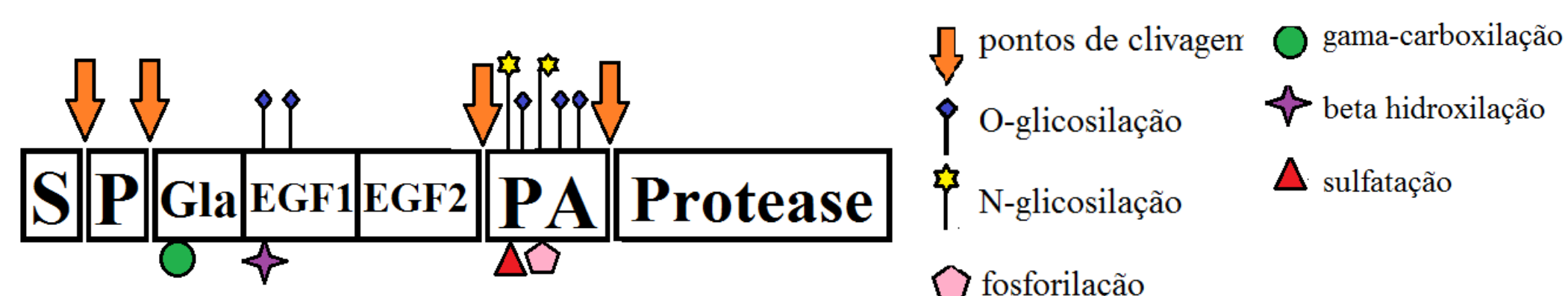


Figura 2: Representação da estrutura proteica do FIX com suas modificações pós-traducionais.

Com a análise do potencial eletrostático dos modelos gerados para essas mutações, foram encontradas alterações no domínio catalítico quando ocorre a mutação His302Arg. O mesmo não ocorre para o domínio GLA considerando a mutação Phe55Cys, o que sugere que dano causado está ligado à modificações pós-traducionais.

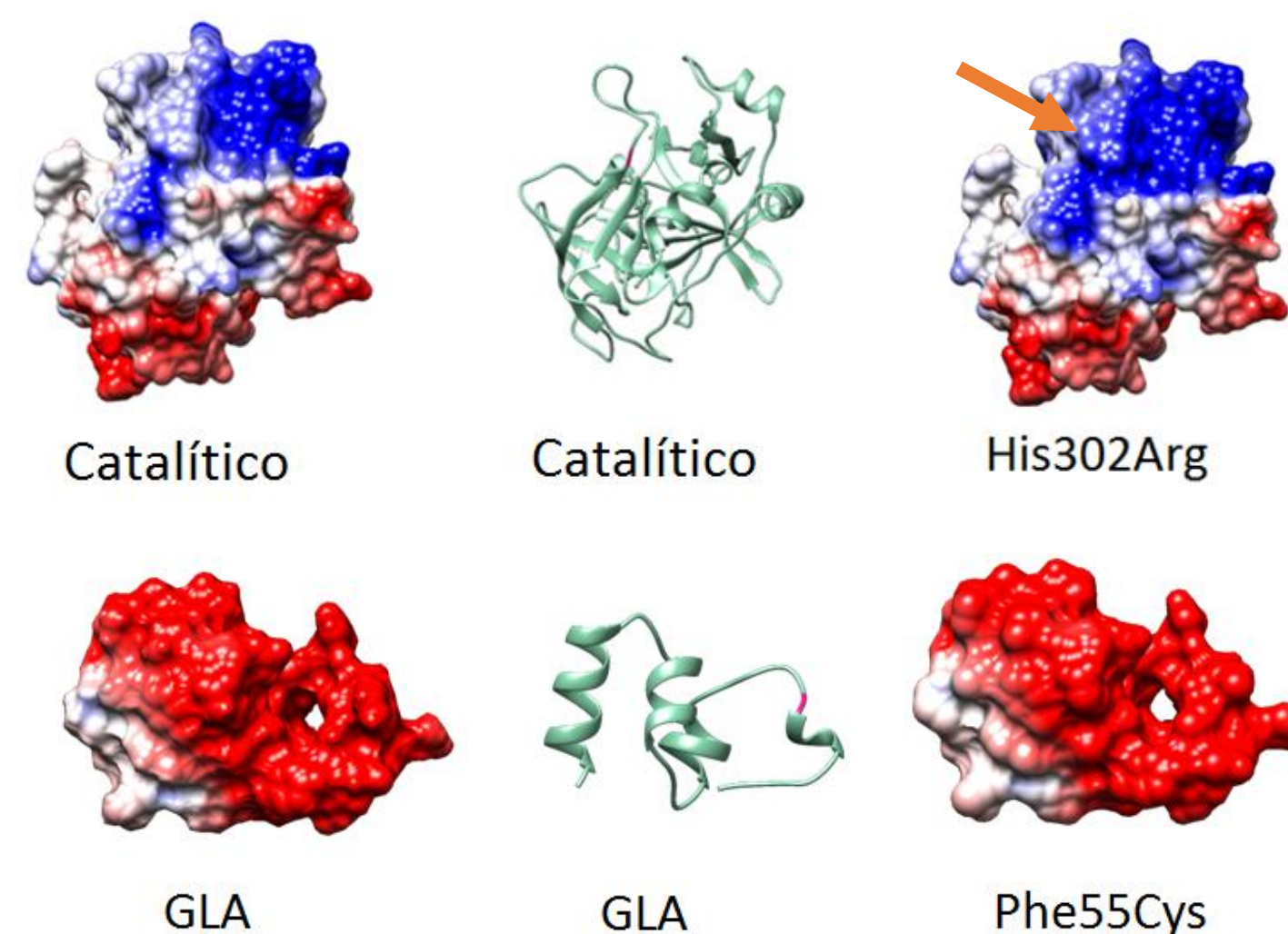


Figura 3: Comparação entre o potencial eletrostático das estruturas geradas.

## REFERÊNCIAS:

- Adzhubei I Jordan DM and Sunyaev SR (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 7:Unit7.20.  
Kelley LA Mezulis S Yates CM Wass MN and Sternberg MJ (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845-858.  
Sarkar S Witham S Zhang J Zhenirovskyy M Rocchia W and Alexov E (2013) DelPhi Web Server: A comprehensive online suite for electrostatic calculations of biological macromolecules and their complexes. *Commun Comput Phys* 13:269-284.  
Venselaar H Te Beek TA Kuipers RK Hekkelman ML and Vriend G (2010) Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 11:548.