



## EFEITO DAS MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ATAXIA COM APRAXIA OCULOMOTORA TIPO 2 NA SUMOILAÇÃO DA PROTEÍNA SENATAXINA HUMANA: ANÁLISE IN SILICO

<sup>1</sup>Lucas Mesquita Cardoso (mestrando-CNPq); <sup>1</sup>Luiz Felipe Sarmento Bonet (doutorando-CNPq); <sup>1</sup>Joelma Freire de Mesquita (orientadora).

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

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq, CAPES, DAAD, NVIDIA, FINEP, UNIRIO.

Palavras-chave: Senataxina, SETX, SUMOilação, Ataxia com Apraxia Oculomotora Tipo 2, AOA2, In Silico.

**Resumo:** A senataxina humana (SETX) é uma proteína helicase DNA-RNA, que controla a qualidade da transcrição após extensa SUMOilação da sua região N-terminal. No entanto, mutações missense no gene SETX podem diminuir sua SUMOilação e estão associadas a doenças neurodegenerativas, como a Ataxia com Apraxia Oculomotora tipo 2 (AOA2). O presente estudo objetiva analisar o efeito das mutações sobre a SUMOilação na região N-terminal. Após compilação das mutações descritas no banco de dados UniProt, selecionou-se oito variantes: M274I + R1294C; M274V + L1976R; W305C; I331K; R332W + V1386I; P413L; P496L; e N603D + Q653K. Através do preditor GPS-SUMO 2.0, identificados sete peptídios de sítio de SUMOilação (SSP) na região N-terminal da variante nativa com score de alta probabilidade (K78, K180, K339, K589, K596, K598 e K621). SSP's com score de alta probabilidade foram encontrados nas regiões adjacentes às mutações I331K, R332W, N603D e Q653K. Apenas a variante N603D + Q653K apresentou alterações significativas dos scores, demonstrando um possível aumento de suscetibilidade à SUMOilação. As demais variantes não demonstraram impactar diretamente os sítios de SUMOilação da SETX. A capacidade das variantes W305C e P496L de diminuir a SUMOilação, conforme descrita na literatura, deve estar associada a outros fatores desconhecidos. Com isso, a análise indica novos apontamentos que contribuem para a explicação da patogenia da AOA2.

**Introdução:** A senataxina humana (SETX) é uma proteína com 2677 aminoácidos e dois domínios preservados evolutivamente em organismos cordados. Um deles é descrito como um domínio DNA-RNA helicase (resíduos 1,931-2,456) e o outro como uma região N-terminal (resíduos 1-668), homóloga à proteína Sen1p2 da *Schizosaccharomyces pombe* (CHEN et al., 2006; MOREIRA et al., 2004). O prefixo "sen" foi adotado, pois foi encontrada homologia entre essa nova proteína e a helicase da levedura, a Sen1p. O "sen" foi combinado com "ataxia" para formar a Senataxina (BENNETT; LA SPADA, 2021). A SETX é encontrada principalmente no núcleo da célula (SURAWEERA et al., 2007). Após extensa SUMOilação por SUMO 2/3 na região N-terminal, o SETX contribui para a acurada manipulação de RNA junto com o componente do exossomo 9 (Exo9), promovendo o controle de qualidade da transcrição. (RICHARD; FENG; MANLEY, 2013). A SUMOilação é uma modificação pós-traducional de proteínas, na qual um membro da família de proteínas modificadoras pequenas semelhantes à ubiquitina (SUMO) é conjugado a resíduos de lisina (Lys) em proteínas-alvo. A modificação da SUMOilação é um processo reversível e dinâmico, no qual as proteínas modificadas podem ser desSUMOiladas por proteases específicas de sentrina/SUMO (SENPs) (GUO; HENLEY, 2014). A ligação reversível de uma SUMO a uma proteína é controlada por uma via enzimática análoga à via de ubiquitinação (JOHNSON, 2004). Foi descrito que a SUMOilação regula a localização subcelular de proteínas, ligação proteína-DNA, interações proteína-proteína, regulação transcripcional, reparo de DNA e organização do genoma (PRINCZ; TAVERNARAKIS, 2017). Três mutações da SETX associadas à ataxia com apraxia oculomotora tipo 2 (AOA2) foram estudadas com ensaios direcionados de sistema duplo-híbrido em levedura. Cada uma dessas

mutações mostrou perda de interação com Exosc9 e diminuição da SUMOilação da SETX (RICHARD; FENG; MANLEY, 2013). A AOA2 é caracterizada pelo início precoce de ataxia cerebelar e da neuropatia periférica sensório-motora axonal (ICHIKAWA et al., 2013) Outros aspectos clínicos incluem disartria (cuja presença pode ser identificada em 100% dos indivíduos com AOA2), nistagmo (91%) e estrabismo (30%) (DUQUETTE et al., 2005) além de tremores (14%), posturas distônicas (13,5%) e coreia (9,5%) (ANHEIM et al., 2009) A apraxia oculomotora é um sintoma inconstante, presente em aproximadamente 50% dos pacientes com AOA2 (ICHIKAWA et al., 2013) devendo a isso seu outro nome sugerido por Duquette e seus colaboradores (2005) ataxia espinocerebelar, autossômica recessiva, com neuropatia axonal tipo 2 (SCAN2). Apesar da contínua expansão do número de genes associados às ataxias cerebelares (FOGEL, 2012; FOGEL; PERLMAN, 2007; GÁLVEZ-JIMÉNEZ; TUITE, 2011; SHAKKOTTAI; FOGEL, 2013) pouco se sabe sobre as bases moleculares de sua patogenia, como observado com a AOA2. O conhecimento da patogenia pode apoiar o desenvolvimento de novas terapias. Além disso, estudos em nível molecular fornecem maneiras de identificar os mecanismos afetados por mutações para investigação posterior (FOGEL et al., 2014).

**Objetivo:** O presente estudo objetiva analisar como as mutações na proteína SETX associadas à AOA2 presentes na região N-terminal podem afetar sua SUMOilação.

**Metodologia:** A sequência de aminoácidos da proteína SETX humana nativa foi obtida no banco de dados UniProt [ID: Q7Z333] (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2023), bem como suas mutações associadas à AOA2 localizadas na região N-terminal. As sequências das variantes mutantes foram criadas com base na expressão por alelo, tal como são descritas na literatura científica (ASAKA et al., 2006; BASSUK et al., 2007; DATTA; HOHLER, 2013; MOREIRA et al., 2004; NANETTI et al., 2013). Dessa forma, as mutações presentes em um mesmo alelo foram combinadas e para cada combinação criou-se apenas uma sequência. Para predizer os peptídeos de sítio de SUMOilação (SSP), as sequências nativa da SETX e das suas variantes foram submetidas à análise pelo algoritmo GPS-SUMO 2.0 (GOU et al., 2024). O algoritmo GPS-SUMO 2.0 identifica os SSP a partir dos aminoácidos de lisina (K) e dos resíduos adjacentes, considerando até 30 resíduos nos dois sentidos da cadeia peptídica. No seu desenvolvimento, foram usados 52.404 sítios de SUMOilação não redundantes. O GPS-SUMO 2.0 classifica os SSP conforme a probabilidade de serem verdadeiros positivos, separando-os em alta probabilidade (score >0,77), média probabilidade (score entre 0,77 e 0,68) e baixa probabilidade (score entre 0,68 e 0,59). As especificidades do GPS-SUMO 2.0 são iguais a 95,17%, 90,46% e 85,01% para os SSP de alta, média e baixa probabilidade respectivamente. No presente estudo, também foram empregadas mais duas classificações: improvável (score entre 0,59 e 0,01) e probabilidade zero. Para analisar a interferência das mutações sobre os SSP, foram comparados os valores de score dos SSP localizados nas regiões adjacentes às mutações, especificamente nos 30 aminoácidos adjacentes pelo GPS-SUMO 2.0. Avaliou-se a capacidade da mutação aumentar ou diminuir a suscetibilidade dos resíduos à SUMOilação.

**Resultados:** A partir do banco de dados UniProt, foram compiladas nove mutações missense localizadas na região N-terminal da SETX (aa1-668), sendo duas delas expressas em combinação. Outras três combinações foram encontradas com mutações localizadas fora da região N-terminal. Com isso, oito variantes foram selecionadas para o presente estudo, as quais são: (1) M274I + R1294C; (2) M274V + L1976R; (3) W305C; (4) I331K; (5) R332W + V1386I; (6) P413L; (7) P496L; e (8) N603D + Q653K. As variantes compiladas foram observadas em famílias de diferentes origens étnicas distribuídas por sete países ao todo. Embora a AOA2 seja caracterizada como de herança autossômica recessiva, as variantes I331K, P486L e N603D + Q653K foram identificadas em indivíduos heterozigóticos com a neuropatia. A análise do perfil de SUMOilação através do preditor GPS-SUMO 2.0 identificou sete sítios de SUMOilação com score de alta probabilidade na região N-terminal (K78, K180, K339, K589, K596, K598 e K621). Sítios com score de média probabilidade foram preditos nos resíduos K19, K441, K613, K629 e K659. Além desses, foram indicados sítios com score de baixa probabilidade nos resíduos K75, K119, K422, K491, K544, K647 e K651. SSP's com score de alta probabilidade foram encontrados nas regiões adjacentes às mutações I331K, R332W, N603D e Q653K. Nas regiões adjacentes às mutações M274I, M274V e W305C foram encontrados apenas SSP's com score de predição improvável. Ao se comparar a variação dos scores entre a variante nativa e as variantes mutantes, apenas a variante N603D + Q653K apresentou alterações significativas dos scores, demonstrando um possível aumento de suscetibilidade à SUMOilação. No presente estudo, as demais variantes não demonstraram

impactar diretamente os sítios de SUMOilação da SETX. Portanto, a capacidade das variantes W305C e P496L de diminuir a SUMOilação, conforme observada por Richard e colaboradores (2013), deve estar associada a outros fatores desconhecidos.

**Conclusões:** Ao verificar se as mutações na região N-terminal da SETX modificam os sítios de ligação isopeptídica com a proteína SUMO, foi possível observar que apenas a variante N603D + Q653K impacta diretamente os SSP's, possivelmente aumentando a suscetibilidade à SUMOilação. Em contraposição, as variantes W305C e P496L, que experimentalmente foram capazes de diminuir a SUMOilação, não demonstram impactar de forma direta os SSP's. Por conseguinte, é presumível que elas produzem tais efeitos através de mecanismos não elucidados. Embora, os efeitos das mutações sobre a SUMOilação da SETX ainda não estejam extensamente compreendidos, a presente análise foi capaz de indicar novos apontamentos que contribuem para a explicação da patogenia da AOA2.

#### Referência:

- ANHEIM, M. et al. Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain*, v. 132, n. 10, p. 2688–2698, 1 out. 2009.
- ASAKA, T. et al. Autosomal recessive ataxia with peripheral neuropathy and elevated AFP: novel mutations in SETX. *Neurology*, v. 66, n. 10, p. 1580–1581, maio 2006.
- ASHKENAZY, H. et al. ConSurf 2016 : an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. May, p. 344–350, 2016.
- BASSUK, A. G. et al. In cis autosomal dominant mutation of Senataxin associated with tremor/ataxia syndrome. *Neurogenetics*, v. 8, n. 1, p. 45–49, jan. 2007.
- BENNETT, C. L.; LA SPADA, A. R. SUMOylated Senataxin functions in genome stability, RNA degradation, and stress granule disassembly, and is linked with inherited ataxia and motor neuron disease. *Molecular genetics & genomic medicine*, v. 9, n. 12, p. e1745, dez. 2021.
- CHEN, Y.-Z. et al. Senataxin, the yeast Sen1p orthologue: Characterization of a unique protein in which recessive mutations cause ataxia and dominant mutations cause motor neuron disease. *Neurobiology of Disease*, v. 23, n. 1, p. 97–108, 2006.
- DA SILVA, A. N. R. et al. In silico analysis of alpha-synuclein protein variants and posttranslational modifications related to Parkinson's disease. *Journal of cellular biochemistry*, v. 125, n. 3, p. e30523, mar. 2024.
- DATTA, N.; HOHLER, A. A new SETX mutation producing AOA2 in two siblings. *The International journal of neuroscience*, v. 123, n. 9, p. 670–673, set. 2013.
- DUQUETTE, A. et al. Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Annals of neurology*, v. 57, n. 3, p. 408–414, mar. 2005.
- FOGEL, B. L. Childhood cerebellar ataxia. *Journal of child neurology*, v. 27, n. 9, p. 1138–1145, set. 2012.
- FOGEL, B. L. et al. Mutation of senataxin alters disease-specific transcriptional networks in patients with ataxia with oculomotor apraxia type 2. *Human molecular genetics*, v. 23, n. 18, p. 4758–4769, 15 set. 2014.
- FOGEL, B. L.; PERLMAN, S. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *The Lancet Neurology*, v. 6, n. 3, p. 245–257, 1 mar. 2007.
- GALVEZ-JIMÉNEZ, N.; TUISTE, P. *Uncommon Causes of Movement Disorders*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011.
- GOU, Y. et al. GPS-SUMO 2.0: an updated online service for the prediction of SUMOylation sites and SUMO-interacting motifs. *Nucleic Acids Research*, v. 52, n. W1, p. W238–W247, 5 jul. 2024.
- GUO, C.; HENLEY, J. M. Wrestling with stress: roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response. *IUBMB life*, v. 66, n. 2, p. 71–77, fev. 2014.
- ICHIKAWA, Y. et al. Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *Journal of the neurological sciences*, v. 331, n. 1–2, p. 158–160, ago. 2013.
- JOHNSON, E. S. Protein modification by SUMO. *Annual review of biochemistry*, v. 73, p. 355–382, 2004.
- LANDAU, M. et al. ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic acids research*, v. 33, n. Web Server issue, p. W299–W302, 1 jul. 2005.
- MOREIRA, M. C. et al. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nature Genetics*, v. 36, n. 3, p. 225–227, 2004.
- NANETTI, L. et al. SETX mutations are a frequent genetic cause of juvenile and adult onset cerebellar ataxia with neuropathy and elevated serum alpha-fetoprotein. *Orphanet journal of rare diseases*, v. 8, p. 123, ago. 2013.
- PRINCZ, A.; TAVERNARAKIS, N. The role of SUMOylation in ageing and senescent decline. *Mechanisms of ageing and development*, v. 162, p. 85–90, mar. 2017.
- RICHARD, P.; FENG, S.; MANLEY, J. L. A SUMO-dependent interaction between Senataxin and the exosome, disrupted in the neurodegenerative disease AOA2, targets the exosome to sites of transcription-induced DNA damage. *Genes & development*, v. 27, n. 20, p. 2227–2232, out. 2013.
- SHAKKOTTAI, V. G.; FOGEL, B. L. Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurologic clinics*, v. 31, n. 4, p. 987–1007, nov. 2013.
- SURAWEEERA, A. et al. Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. *Journal of Cell Biology*, v. 177, n. 6, p. 969–979, 18 jun. 2007.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D523–D531, 6 jan. 2023.
- YARIV, B. et al. Using evolutionary data to make sense of macromolecules with a “face-lifted” ConSurf. *Protein Science*, v. 32, n. 3, p. e4582, 1 mar. 2023.