



Clonagem e análise de regiões candidatas a elementos Cis-regulatórios de genes envolvidos com a severidade da COVID-19

Palavras-Chave: Elementos Cis-regulatórios; COVID-19; Distúrbios de coagulação

Autores(as):

DAVI MAIA DE ARRUDA, FOP – UNICAMP

HELLEN FERREIRA DE SOUZA SOBRINHO (colaboradora) FOP - UNICAMP

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES (orientador), FOP - UNICAMP

1) RESUMO DO PROJETO INICIAL

Este projeto possui dois objetivos principais. O primeiro é treinar o candidato à bolsa em técnicas básicas de biologia celular e molecular. O segundo objetivo é realizar as clonagens de dois novos candidatos a elementos cis-regulatórios que, potencialmente, podem estar envolvidos com a patogênese da COVID-19. Tais elementos foram preditos em um projeto em andamento do nosso grupo de pesquisa. Após a realização das clonagens, os constructos, incluindo controles, serão transfectados em células LX-2 e HepG2 para verificar se as sequências preditas podem modular transcrição gênica in vitro, o que será medido por meio de luminescência (gene repórter luciferase).

2) JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO

Embora no projeto em andamento financiado pela FAPESP o objetivo seja estudar apenas uma região candidata a elemento cis-regulatório (enhancer) com o decorrer do projeto nós levantamos dados que sugerem que outras regiões que estão próximas à região que está sendo estudada, possuem variantes genéticas previamente associadas às doenças tromboembólicas e foram também associadas à COVID-19 severa.

Um dos experimentos para validação de candidatos a elementos cis-regulatórios é a clonagem deste elemento em vetores com gene reporter da luciferase. De forma que o objetivo é verificar se determinada sequência é capaz de modular transcrição gênica.

Portanto, este projeto tem dois principais objetivos:

a) Em um primeiro momento será realizado um treinamento do candidato à bolsa em técnicas básicas de biologia celular e molecular (PCR, eletroforese, clonagem, sequenciamento), junto à pós-graduandos que estão desenvolvendo o projeto principal citado acima.

b) Padronizar e executar a clonagem de dois dos novos candidatos a elementos cis-regulatórios do projeto em questão que está sendo desenvolvido. Posteriormente, testar se estes dois candidatos podem modular transcrição, o que será realizado por meio de transfecção dos constructos em células HepG2e LX2.

3) ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO SEGUNDO SEMESTRE DE BOLSA

3.1) Clonagem Seq8

Após a primeira sequência Seq3 ser clonada no primeiro semestre do projeto, iniciou-se a clonagem da segunda sequência, Seq8, planejada para ser testada em ensaio de luciferase repórter. A sequência Seq8 (chr9:136147280-136147855) que contém a variante genética rs660340 previamente associada a níveis de fatores envolvidos no processo de coagulação e também já associado à COVID-19 severa, foi sintetizada com a adição das bases CTCGAG na extremidade 5' e das bases e AGATCT na extremidade 3', e em seguida foi clonada nos sítios BgIII e XhoI em vetor pGL3 promoter. Para a confirmação da sequência clonada, os constructos inicialmente foram digeridos (BamH1 e HindIII), em que se observou o padrão de bandas com tamanho esperado (Figura 1). Em seguida o constructo clonado foi confirmado por meio de sequenciamento sanger utilizando-se o primer 5'- CTAGCAAATAGGCTGTCCC – 3' para a checagem da sequência com a variante genética esperada.

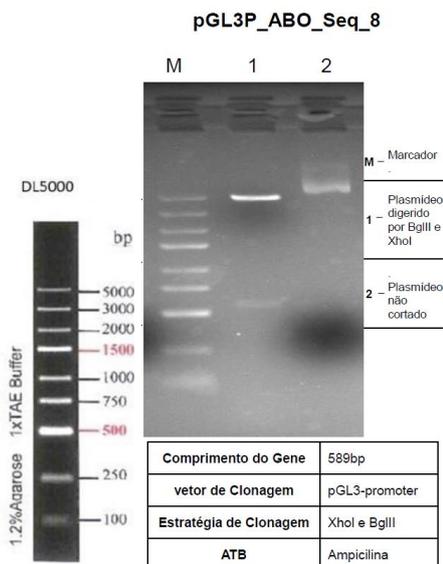


Figura 1. Figura de um gel de eletroforese com o controle da digestão do constructo Seq8 clonado em plasmídeo pGL3 promoter.

3.2) Padronização e execução do ensaio de Luciferase

A transfecção foi padronizada inicialmente utilizando-se o plasmídeo pEGFP, testando-se dois kits de transfecção: FuGENE® 6 Transfection Reagent (Cat. E2691 – da Promega), e Lipofectamina 3000 (Invitrogen L3000001). Os volumes recomendados de acordo com os kits foram adaptados proporcionalmente para uma placa de 24 poços. Plaqueando-se 1×10^5 células/poço, e variando o meio presente no poço pré-transfecção (troca do meio 2 horas antes), DMEM (+10% FBS, sem antibiótico) ou Opti-MEM (sem antibiótico).

Com o kit de transfecção da Promega, foram testadas três diferentes concentrações do agente de transfecção em relação à quantidade de DNA (FuGENE6® Transfection Reagent: DNA), 1,5:1, 3:1 e 6:1, todas com volume final de 25 uL e utilizando Opti-MEM como veículo. As três concentrações obtiveram transfecção, porém nenhuma com uma cobertura maior que ~ 10% do poço. Já com o kit de Lipofectamina da Invitrogen, foram testados dois volumes de agente de transfecção, 0,75 uL e 1,5 uL de Lipofectamina 3000, também utilizando Opti-MEM como veículo. Notou-se também que ambas as concentrações de lipofectamina obtiveram quantidades parecidas de transfecção, sendo que aproximadamente 20% das células nos poços estavam transfectadas. Foi então definido utilizar-se o kit de Lipofectamina 3000 da Invitrogen, com um volume de 0,75 uL por transfecção para as futuras transfecções. Adicionalmente, notou-se que os poços com DMEM mantiveram mais células vivas do que os poços com Opti-MEM, portanto, todas as trocas de meio pré-transfecção foram feitas com o meio apropriado para o tipo de célula com 10% FBS e sem antibióticos.

Para definir a quantidade de células para o ensaio foram realizados experimentos, sendo o primeiro para HepG2 testando quantidade de 100.000, 150.000 e 200.000 células. Foi observado que quanto menor o número de células, maior era a eficiência de transfecção. Depois foi experimentado para HepG2 e LX-2 as quantidades de 20.000 e 50.000 células. Observou-se que com 20.000 células não se obteve transfecção muito eficiente, mas com 50.000 células houve uma quantidade de transfecção que consideramos adequado. Assim foi definido o uso de 50.000 células por poço para plaqueamento em uma placa de 24 poços.

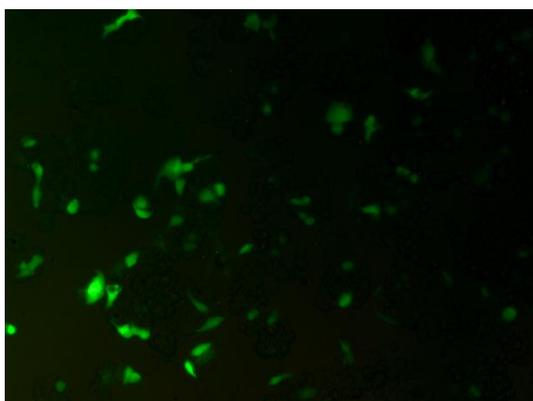


Figura 2. Transfecção de 10ng de plasmídeo GFP + Lipofectamina 3.000 em placas de 24 poços com células HepG2. Fotomicrografia realizada 24 hs após transfecção.

3.3) Ensaio de Luciferase

Após definido os primeiros parâmetros do protocolo para o ensaio, realizou-se então uma padronização com plasmídeos que expressam Luciferase. Foram feitos testes em HepG2 e LX-2, 50.000 células/poço, e foram

utilizadas massas de 10 ng e 50 ng de plasmídeos pGL3, inicialmente com uma proporção 1:1 de plasmídeo com luciferase Firefly e plasmídeo com luciferase Renilla pRL-SV40 (Firefly:Renilla = 1:1). Notou-se que quantidades excessivas de Renilla podem mascarar o efeito da luciferase Firefly nos plasmídeos pGL3.

Em seguida, testamos diferentes razões de Firefly:Renilla, a fim de diminuir ainda mais o sinal de Renilla, porém ainda mantê-lo presente para normalização. Testamos razões 10:1 e 20:1, variando a quantidade dos plasmídeos pGL3 entre 10 ng e 50 ng. Como esperado, houve maior expressão de luciferase Firefly em poços com 50 ng de plasmídeo Firefly, e uma menor expressão de Renilla nos poços com a razão 20:1.

Finalmente, testamos uma quarta razão, de 100:1 de Firefly:Renilla, e os resultados para normalização ficaram melhores. Os sinais de luciferase Firefly estavam bem enriquecidos, e os de Renilla se mantiveram numa margem boa entre poços, assim economizando material.

Após a padronização, células hepáticas humanas HepG2 e LX-2 foram transfectadas separadamente com 50ng de cada um dos plasmídeos (ABO_seq3 a ABO_seq8) por poço, e com plasmídeo pRL-SV40, com uma razão Firefly:Renilla de 100:1. A luminescência foi medida 24 h após a realização das transfecções, utilizando-se do kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega E1910) e um leitor de microplacas (Veritas Luminometer - Promega). Todas as amostras foram testadas em triplicata. Como controle negativo utilizou-se o plasmídeo pGL3 promoter (vetor vazio).

O ensaio de luciferase demonstrou que as sequências Seq3 e Seq8 apresentaram diminuição da atividade de expressão de luciferase ($p > 0,05$) quando transfectadas em células LX-2. No entanto, as mesmas sequências não apresentaram diminuição estatisticamente significativa de luciferase em células HepG2.

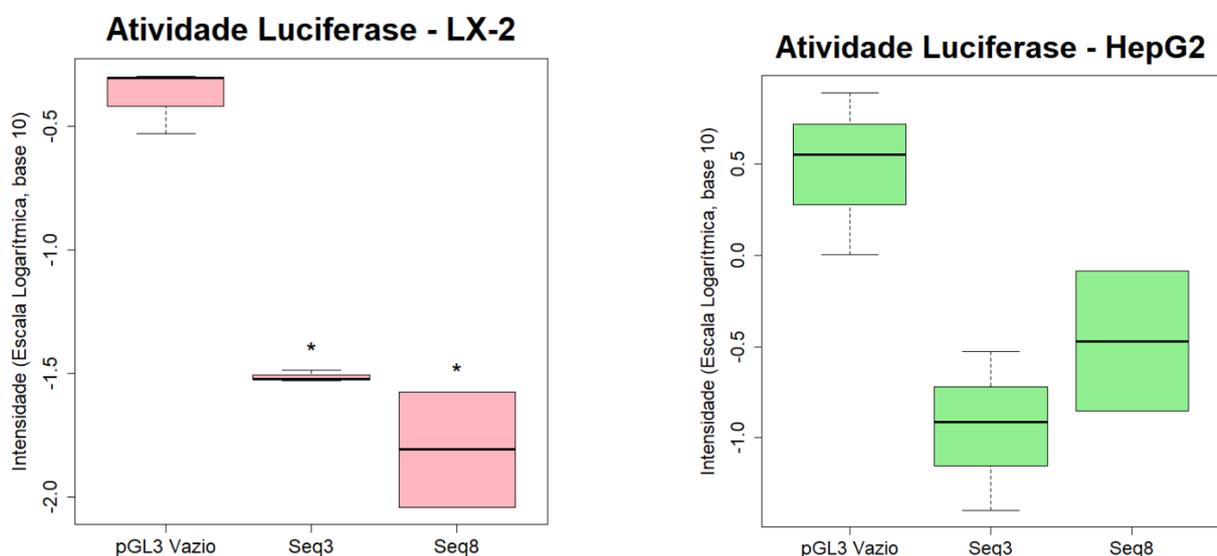


Figura 3. Gráficos representativos dos resultados obtidos do ensaio de luciferase para as sequências Seq3 e Seq8 em pGL3 quando transfectadas em células LX-2 ou células HepG2. As sequências Seq3 e Seq8 apresentaram diminuição da atividade de expressão de luciferase ($p > 0,05$) quando transfectadas em células LX-2.

4) CONCLUSÃO

Embora este projeto seja apenas parte de um projeto maior onde diferentes candidatos (com diferentes tamanhos e variantes genéticas) estão sendo testados enquanto moduladores de atividade de expressão gênica, os resultados aqui obtidos demonstraram que as sequências Seq3 e Seq8 podem modular a expressão gênica em células LX-2. Durante o período da pesquisa, o aluno recebeu treinamento em técnicas básicas de biologia celular e molecular (PCR, eletroforese, clonagem, sequenciamento).

5) REFERÊNCIAS

1. Nat Genet. 2003 Mar;33 Suppl:228-37. doi: 10.1038/ng1090.
2. Nat Rev Genet. 2008 May;9(5):356-69. doi: 10.1038/nrg2344.
3. Biol Chem. 2014 Dec;395(12):1453-60. doi: 10.1515/hsz-2014-0109
4. Nat Rev Genet. 2018 Mar;19(3):175-185. doi: 10.1038/nrg.2017.89.
5. Nat Biotechnol. 2012 Nov;30(11):1095-106. doi: 10.1038/nbt.2422.
6. Trends Genet. 2012 Jun;28(6):276-84. doi: 10.1016/j.tig.2012.02.008.
- 7-. Cell. 2011 Oct 28;147(3):577-89. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.044.
8. Nat Rev Genet. 2012 Sep;13(9):613-26. doi: 10.1038/nrg3207.
9. Cell Stem Cell. 2012 Nov 2;11(5):633-48.
10. Genome Med. 2011 Jun 7;3(6):36. doi: 10.1186/gm252.
11. Genome Res. 2012 Sep;22(9):1748-59. doi: 10.1101/gr.136127.111.
12. Science. 2012 Sep 7;337(6099):1190-5. doi: 10.1126/science.1222794.
13. Validação funcional de um locus gênico como elemento cis-regulatório associado a distúrbios de coagulação e à COVID-19 severa. Projeto de Pesquisa financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Endereço do projeto na página da FAPESP <https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/108019/validacao-funcional-de-um-locus-genico-como-elemento-cis-regulatorio-associado-a-disturbios-de-coagu/>
14. N Engl J Med 2020; 383:1522-1534. doi: 10.1056/NEJMoa2020283.
15. Nat Genet. 2016; 48:1313-1320. doi: 10.1038/ng.3573.
16. Blood. 2019 Nov 7;134(19):1645-1657. doi: 10.1182/blood.201900043.
17. Circulation. 2019 Jan 29;139(5):620-635. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034532.
18. Long et al, 2020.