



CIS-REGULATÓRIOS DE GENES ENVOLVIDOS COM DISTÚRBIOS DE COAGULAÇÃO E SEVERIDADE DA COVID19

Palavras-Chave: REGULAÇÃO GÊNICA, COVID-19, DISTÚRBIOS DE COAGULAÇÃO

Autores(as):

Allefe Gabriel da Silva Melo, FOP – UNICAMP

Hellen Ferreira de Souza Sobrinho, FOP - UNICAMP

Douglas Victorino Esposito, FOP - UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, FOP – UNICAMP

INTRODUÇÃO

1.1 Estudos genéticos e elementos cis-regulatórios

Elucidar a base genética de doenças humanas tem sido um dos principais objetivos da medicina molecular no último século. Grandes avanços foram feitos na descoberta das mutações responsáveis por distúrbios monogênicos mendelianos, que normalmente ocorrem nas sequências de codificação de genes e alteram a estrutura proteica¹. No entanto a descoberta de variantes genéticas envolvidas em distúrbios humanos mais comuns e complexos (por exemplo: câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, neurológicas) provou ser consideravelmente mais desafiador². Esses distúrbios complexos mostram etiologia poligênica e multifatorial, significando que vários loci genéticos podem contribuir para a doença, juntamente com estilos de vida e fatores ambientais^{2,3}.

Os recentes avanços nos métodos de sequenciamento de DNA, aliado à diminuição de custos, permitiram o desenvolvimento de estudos de associações genômicas (GWAS), em que a associação de milhares de variantes genéticas (por exemplo, SNPs) com uma característica específica (por exemplo, doença) pode ser examinada em grande número de indivíduos. Isso resultou em um grande número de GWAS sendo relatados nos últimos anos, os quais estudaram muitos distúrbios complexos humanos³.

Como resultado desse aumento recente e maciço de GWAS, agora existe um catálogo de milhares de variantes genéticas associadas a centenas de distúrbios humanos complexos, que prometem dramaticamente melhorar a compreensão molecular, diagnóstico e tratamento de doenças humanas^{3,4}. No entanto, essas expectativas foram atenuadas à medida que estão começando a entender que a interpretação do GWAS resultados está longe de ser simples.

Uma observação recorrente no GWAS é que a maioria dos SNPs (70-90%) associados a doenças humanas estão localizados dentro da fração não codificante do genoma humano^{3,5}. Em comparação com as sequências de codificação, a função molecular do espaço genômico não codificante é pouco caracterizada e mais difícil de prever usando ferramentas bioinformáticas. Como resultado, e com algumas exceções, a função molecular das variantes genéticas associadas com distúrbios humanos complexos permanece em grande parte desconhecido^{3,5}.

Elementos cis-regulatórios chamados de enhancers são o principal determinante da expressão gênica que responde por especificar cada tipo celular¹. Uma característica central dos enhancers é sua capacidade de funcionar como plataformas integradas de ligação a fatores de transcrição, reconhecidas pelos principais especificadores de linhagem e efetores de ligação a DNA das vias de sinalização^{3,6,7}. Enhancers são sequências de DNA compactas (~200–500 bp) e controlam a expressão de genes-alvo a longas distâncias de maneira independente da orientação^{8,9}. Em contraste para sequências codificadoras ou promotores de genes, enhancers normalmente não possuem características estereotipadas, como uma definição de sequência ou posição relativa fixa com respeito aos genes-alvo⁸.

Dada a abundância e relevância dos enhancers, especula-se que uma fração significativa destas doenças associadas a variações genéticas pode ocorrer dentro dos elementos reguladores cis, potencialmente alterando sua atividade e, finalmente, levando a mudanças quantitativas na expressão gênica e suscetibilidade aumentada à doença humana^{10,11}. Recentes esforços epigenômicos em larga escala começaram a confirmar essas previsões e, de fato, uma significativa fração de variantes genéticas de doenças comuns parece sobrepor elementos cis-regulatórios^{3,12}.

1.2 Estudo em andamento envolvendo variantes genéticas, elementos cis-regulatórios genéticos, COVID19 e coagulopatias.

Embora haja um acelerado avanço no conhecimento da patogênese da COVID-19, o conhecimento sobre as causas que levam pacientes a responderem de formas diferentes durante a evolução dessa doença ainda é limitado. Isso sugere que há fatores genéticos que possam ajudar a determinar como cada indivíduo responde à infecção pelo SARS coronavírus 2. Atualmente nós temos um estudo em andamento, financiado pela FAPESP¹³, em que estamos fazendo validações funcionais que possam vir a comprovar que uma região do genoma humano, associada a COVID-19¹⁴ severa e a doenças tromboembólicas, possa ser uma região regulatória da expressão de um gene chave do processo de coagulação. Este mesmo gene está também associado a coagulopatias, e sua desregulação foi também associada à COVID-19 severa.

Elementos cis-regulatórios, denominados de enhancers, são os principais determinantes da especificidade da expressão gênica, nos diferentes tipos celulares¹⁵. Além disso, enhancers estão envolvidos na predisposição genética a doenças. No projeto em andamento financiado pela FAPESP, propomos realizar ensaios que busquem comprovar, funcionalmente, que o enhancer, predito por análises *in silico*, está envolvido na regulação transcricional do referido gene. Para isso, estão sendo realizados principalmente os seguintes ensaios: atividade de enhancer *in vitro* por meio do gene repórter luciferase; ATAC-seq, captura da conformação da cromatina (3C), deleção da região do enhancer, por meio da tecnologia CRISPR/Cas9 e atividade de enhancer *in vivo*, por meio da geração de embriões transgênicos de camundongos.

OBJETIVO

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 a transcrição gênica, o que será realizado por meio de transfecção dos constructos em células HepG2 e LX2.

MATERIAIS E MÉTODOS

a) Seq10 (chr9:133,278,350-133,278,900) que contém os SNPs rs8176643 e rs532436 previamente associados com níveis de vWF¹⁶ e COVID19 severa¹⁷.

b) Seq12 (chr9:133,250,924-133,251,394) que contém o SNP rs76700116 que foi previamente associado à COVID19 severa¹⁷.

As sequências Seq10 e Seq12 foram sintetizadas com adição de bases na extremidade 5' e na extremidade 3', complementares às geradas pela clivagem das enzimas BgIII e XhoI. Em seguida, foram clonadas nos sítios BgIII e XhoI do vetor pGL3. As clonagens foram confirmadas por meio de digestão com enzimas de restrição e por sequenciamento Sanger.

Após a confirmação das clonagens das sequências em questão, células HepG2 e LX-2 foram transfectadas com 50 ng de cada um dos dois plasmídeos, juntamente com o plasmídeo pRL-SV40, em uma razão Firefly:Renilla de 100:1. A luminescência foi medida 24 horas após a realização das transfecções, utilizando-se o kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega E1910) em um leitor de microplacas (Veritas Luminometer - Promega). Os testes foram realizados em triplicata. Como controle positivo, foi utilizado o plasmídeo pGL3 control (que possui o enhancer SV40), e como controle negativo, o plasmídeo pGL3 promoter (vetor vazio). Os dados obtidos foram anotados e submetidos a teste estatístico adequado.

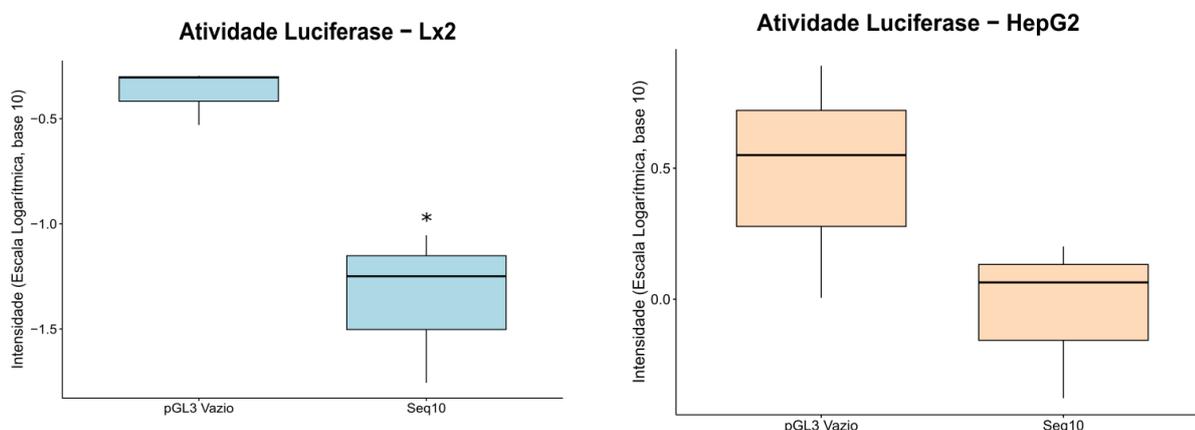
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de Luciferase

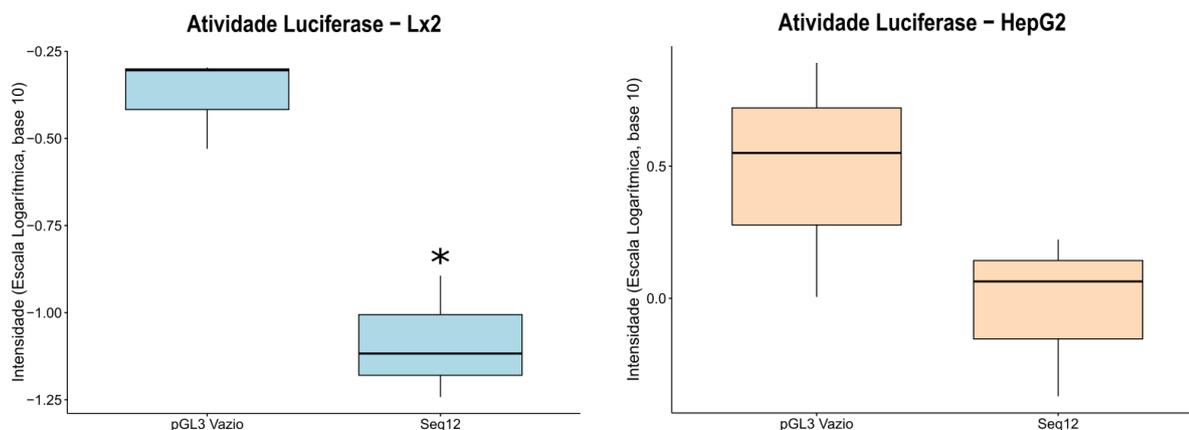
As sequências planejadas para serem testadas em ensaio de luciferase repórter foram clonadas no vetor pGL3 promoter (Promega). Foi utilizada a Seq10 (chr9:133,278,350-133,278,900) e Seq12 (chr9:133,250,924-133,251,394). A Seq10 e Seq12 foram sintetizadas com a adição das bases CTCGAG na extremidade 5' e AGATCT na extremidade 3', sendo posteriormente clonadas nos sítios BgIII e XhoI do vetor pGL3 promoter. Para confirmar a clonagem, os constructos foram inicialmente digeridos com as enzimas BamHI e HindIII, revelando um padrão de bandas com o tamanho esperado. Adicionalmente, as clonagens das referidas sequências foram confirmadas por meio de sequenciamento sanger.

Após a confirmação das clonagens, as células HepG2 (hepatócitos) e LX-2 (células estreladas hepáticas) foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de 50.000 células por poço, e transfectadas separadamente com 50 ng dos plasmídeos contendo a sequência Seq10 e posteriormente foram transfectadas outras células HepG2 e LX-2 com o Seq12, além do plasmídeo pRL-SV40, mantendo a razão *Firefly:Renilla* de 100:1. A luminescência foi medida 24 horas após a transfecção, utilizando o kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega E1910) e um leitor de microplacas Veritas Luminometer (Promega).

Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Como controle positivo, utilizaremos o plasmídeo pGL3 control, que contém o enhancer SV40, enquanto o pGL3 promoter (vetor vazio) servirá como controle negativo. Os dados obtidos foram registrados e analisados estatisticamente utilizando o teste t para grupos independentes.



O ensaio de luciferase demonstrou que a sequência Seq10 resultou em uma redução da atividade de expressão da luciferase quando transfectada em células LX-2. Essa diminuição foi estatisticamente significativa ($p = 0.0237$). Por outro lado, na linhagem HepG2, a sequência não apresentou uma redução estatisticamente significativa na expressão da luciferase ($p = 0.2596$).



O ensaio de luciferase demonstrou que a sequência Seq12 resultou em uma redução da atividade de expressão da luciferase quando transfectada em células LX-2. Essa diminuição foi estatisticamente significativa ($p = 0.0286$). Por outro lado, na linhagem HepG2, a sequência não apresentou uma redução estatisticamente significativa na expressão da luciferase ($p = 0.2627$).

CONCLUSÕES:

A sequência Seq10 e Seq12, associada à COVID-19 severa e a distúrbios de coagulação, demonstrou capacidade de modular a expressão gênica causando uma diminuição de expressão em células LX-2, mas não em HepG2. Esses resultados indicam uma possível função cis-regulatória específica da linhagem celular, sugerindo que variantes em regiões não codificantes podem atuar como elementos regulatórios repressivos.

BIBLIOGRAFIA

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. Nature. 2018 Jun;558(7708):73-79. doi: 10.1038/s41586-018-0175-2. Epub 2018 Jun

17. Hum Mol Genet . 2022 Nov 28;31(23):3945-3966. doi: 10.1093/hmg/ddac158