

VALIDAÇÃO DE LONG NON-CODING RNA (lncRNA) NO FUNGO PATOGENICO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* (PB18)

Ana Carolina Humberto¹; Regina Costa de Oliveira², Yara Natércia Lima Faustino de Maria³, David Aciole Barbosa⁴, Fabiano Bezerra Menegidio⁵, Daniela Leite Jabes⁶, Luiz Roberto Nunes⁷

1. Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: anacarol.dracarys@gmail.com¹
2. Professor do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br²
3. Mestranda do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: yaralima07@gmail.com³
4. Doutorando do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: aciole.d@gmail.com⁴
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:fabianomenegidio@umc.br⁵
6. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: danielajabes@umc.br⁶
7. Orientador do PPG em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: nunes1212@gmail.com⁷

Área do Conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos;

Palavras-Chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; lncRNA; ncRNA; Bioinformática.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis (Pb) é um fungo termodimórfico que pode apresentar-se na forma de micélio ou levedura, variando sua morfologia de acordo com as temperaturas sob às quais for submetido (MENDES *et al.*, 2017). Seu dimorfismo é uma adaptação morfogenética especializada que representa uma parte essencial de sua estratégia de virulência ao infectar seres humanos, causando o estabelecimento de uma micose sistêmica denominada Paracoccidioidomicose (PCM) quando seus conídios/micélios são inalados e entram em contato com os pulmões do hospedeiro, passando então para a fase leveduriforme (MUÑOZ *et al.*, 2018). A descoberta de que apenas 2% dos indivíduos expostos à espécies de *Paracoccidioides* desenvolvem PCM favorece a hipótese de que tanto componentes genéticos humanos quanto dos próprios fungos desempenham algum papel no balanço entre a infecção e a doença (MENDES *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SHIAKANAI-YASUDA *et al.*, 2018). Diante dessa perspectiva, nosso grupo de pesquisa realizou uma análise transcriptômica, com o intuito de examinar pela primeira vez a atividade transcricional dos genes de *Pb* isolado 18 (Pb18) *in vivo*, constatando que 75% deles são transcritos *in vivo* e 19% deles podem exibir isomorfos alternativos. Ademais, 627 dos transcritos não correspondem a nenhum gene mapeado no genoma do fungo, o qual dispõe de 513 ncRNAs (*non-coding* RNAs) e 203 lncRNAs (*long non-coding* RNAs) putativos identificados ineditamente neste microorganismo (MENEGIDIO *et al.*, 2020). No presente trabalho, buscamos explorar com maior destaque os lncRNAs pré-identificados *in silico* em Pb18, os quais são definidos operacionalmente como ncRNAs maiores do que 200 pares de bases, que não aparentam ter um potencial de codificação de proteína e que funcionalmente são capazes de regular a expressão gênica por diferentes mecanismos epigenéticos em todos os domínios biológicos (PONTING *et al.*, 2009; TYCOWSKI *et al.*, 2015; JARROUX *et al.*, 2017) com vistas a validar sua presença *in vivo* em Pb18.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo validar a presença de seis lncRNAs no transcriptoma de leveduras de Pb18 *in vivo*. Ademais, buscou-se identificar regiões conservadas das sequências nucleotídicas desses lncRNAs quando comparadas com as de outros organismos no banco de dados RNACentral (<https://rnacentral.org/>).

METODOLOGIA

Inicialmente, os *primers* de seis lncRNAs selecionados para investigação neste trabalho (quatro com as maiores taxas de *Fragmentos por Quiilobase por Milhão* (do inglês *Fragments per Kilobase per Million*, FPKM) e dois com tamanho aproximado de 400 pares de base (pb) foram elaborados pela plataforma digital IDT DNA (<https://www.idtdna.com>) a partir da sequência FASTA de seus genes (MSTRG.4793.1, MSTRG.4793.2, MSTRG.4058.1, MSTRG.786.1, MSTRG.786.2 e MSTRG.285.1), disponíveis em <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/V9CE5>, segundo os parâmetros: Primer T_m °C min=60/opt=62/max.=65 ; Primer GC (%) 50/50/50; Primer Size (nt) 17/20/22. Na fase experimental, células leveduriformes de Pb18 foram cultivadas em meio líquido rico YPD (Yeast Extract – Peptone Dextrose) modificado e mantidas a 36 °C sob agitação constante (150 rpm). Realizou-se uma curva de crescimento dos fungos com os pré-inóculos (~4-5 dias de cultivo) dessas células, sendo as culturas iniciais da curva ajustadas para D.O.₆₀₀ = 0,2 (densidade óptica) e medidas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000→. Logo após, em triplicata, as amostras foram incubadas e mantidas a 36 °C, sob agitação constante (150 rpm) por 16 e 72 h e seu crescimento foi monitorado a cada 24 h por leituras de D.O.₆₀₀. Em seguida, realizou-se a extração de RNA total a partir de alíquotas de 30 mL das réplicas experimentais dos fungos que, ao final do processo, foram ressuspensas em 200 mL de água e quantificadas por D.O.₂₆₀. Todo o material utilizado para obtenção e tratamento de RNA foi esterilizado e/ou tratado com DEPC para eliminação de RNase e a qualidade final das amostras foi examinada por meio de eletroforese em gel de agarose (0,8%) desnaturante com o marcador RNA Ladder 0.1-2 kB (Invitrogen→). Para síntese de cDNA, efetuou-se um tratamento nas amostras de RNA total com o kit RQ1 DNase (Promega→) segundo o protocolo do fabricante e, em seguida, duas reações contendo (I) 3 µg de RNA total, 2 µL de oligo dT (Invitrogen→ 100 pmol/0,5 µg/µl), 19 µl de H₂O miliQ e (II) os mesmos reagentes de (I) + 1 µL de Random Primer Invitrogen→ foram preparadas. Logo após, um *mix* contendo 6 µL de buffer 5x, 3 µL de DDT 0,1 M , 0,6 µL de dNTP 25 mM e 1 µL de Superscript II (200 U/µL), todos reagentes da Invitrogen→, foi adicionado à cada tubo e estes foram levados ao termociclador à 42 °C por 2 horas e, em seguida, 70°C por 10 minutos. No fim deste período, adicionou-se 1 µL de RNase A (10 mg/mL) às amostras que foram incubadas por 30 minutos à 37°C. Para finalizar o processo, foi necessário efetuar uma purificação do material em colunas Millipore Centrifugal Filters Microcon→. Finalmente, a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se os reagentes padrão da PCR, 100 ng de cDNA e 1 µL de cada um dos *primers* Forward/Reverse (10 µM) específicos para os seis lncRNA de interesse, além de um controle positivo (gene 16S v4/v5). Após as amostras passarem pelos ciclos da PCR, estas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (2%) com o marcador O’rangeRuler 50 pb DNA Ladder (Fermentas→). Finalmente, em âmbito computacional, utilizamos dois critérios diferentes para descobrir lncRNAs conservados de Pb18 no banco de dados RNACentral (<https://rnacentral.org/>): (1) as sequências FASTA dos seis lncRNAs de Pb18 foram alinhadas com outras sequências de lncRNA disponíveis no RNA Central tendo o BLASTN um valor E mínimo (*Expected-value*) < 1e⁻⁵ e semelhança de (2) identidade (ID%) com outros lncRNAs de ≥ 50%. O arquivo final contendo os resultados dos valores E mínimos, Identidade%, Cobertura de Pesquisa% e Lacunas de Alinhamento% de todos os lncRNAs anotados neste estudo foi adicionado à plataforma online OSF, disponível em: <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/V9CE5>.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 18 (Pb18) permaneceram incubadas por 16h e outras três por 72h, sendo o crescimento das células do fungo monitorado por leituras de D.O.₆₀₀ durante este período. A partir dessas amostras, extraiu-se o RNA total em triplicata para cada uma das seis culturas cultivadas. Aquelas que apresentaram maior quantidade de material quantificado por espectrofotômetro NanoDrop → ND-1000 foram purificadas por *clean-up*, tratadas com o kit RQ1 DNase (Promega →) e utilizadas para realizar a síntese de cDNA com os primers oligo dT (Invitrogen →) e Random Primer (Invitrogen →). Seis reações de PCR foram preparadas com *primers* para cada um dos seis lncRNAs de Pb18, levadas ao termociclador, onde passaram pelo processo de desnaturação à 96°C por 5 minutos, 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e finalizando à 4°C. Ao fim do experimento, esperou-se identificar bandas únicas de 238 pb, 285 pb, 247 pb, 586 pb, 670 pb, 116 pb e 335 pb, correspondentes aos lncRNAs MSTRG.4793.1, MSTRG.4793.2, MSTRG.4058.1, MSTRG.786.1, MSTRG.786.2, MSTRG.285.1 e 16S v4/v5 (controle positivo). De todos os genes analisados, apenas o MSTRG.4058.1 apresentou amplificação bem sucedida, além do controle positivo. Ademais, as sequências nucleotídicas de todos os referidos lncRNAs foram comparadas em âmbito computacional com os de outros organismos disponíveis no banco de dados RNACentral (<https://rnacentral.org/>) em vista de identificar se há conservação estrutural interespecie dessas moléculas. Dos seis lncRNAs analisados neste estudo, apenas os transcritos MSTRG.4058.1, MSTRG.786.1 e MSTRG.786.2 tiveram resultados de anotações valor E mínimo < 1e⁻⁵ durante a busca de similaridade contra o banco de dados RNACentral utilizando-se o BLASTN. Para o transcrito MSTRG.4058.1, encontrou-se 5 anotações representativas das espécies *Homo sapiens*, 8 para *Hevea brasiliensis* e uma para *Marmota monax* com lncRNAs similares ao de Pb18. No caso dos transcritos MSTRG.786.1 e MSTRG.786.2, obteve-se o mesmo número de anotações com valor E mínimo < 1e⁻⁵ para cada lncRNA putativo, havendo 3 representantes para a espécie *Oryctolagus cuniculus*, 2 para *Prunus dulcis*, 2 para *Cyprinus carpio*, um para *Marmota monax*, um para *Camelus dromedaries*, um para *Rosa chinensis*, um para *Pogona vitticeps* e um para *Pan troglodytes* (<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/V9CE5>). Em relação ao único lncRNA encontrado *in vivo* em Pb18, o MSTRG.4058.1, observou-se que seu valor de FPKM = 4284.08 apresenta-se elevado em comparação com o de seu gene alvo, identificado como PADG_04983. Esse gene possui FPKM = 104,58, comprimento de 1125 pb e está associado ao fator de clivagem e poliadenilação (CPF), segundo sua anotação no banco de dados ParaDB (BARBOSA *et al.*, 2019). De acordo com essas observações, supomos que o lncRNA MSTRG.4058.1 pode possuir uma função de considerável importância para o metabolismo de Pb18. Contudo, sendo esta a primeira vez que essa classe de RNA foi detectada no fungo, ainda não se sabe qual o seu papel específico no metabolismo de Pb18. Interessantemente, o lncRNA humano mais semelhante ao transcrito MSTRG.4958.1 de Pb18 (lnc-PABC4-7; ID% = 55.3) origina-se do gene da PABC4, que também atua na ligação da cauda poli (A) do mRNA (GORGONI *et al.*, 2011; BEAULIEU *et al.*, 2012). Sabe-se que os CPFs da extremidade 3' do DNA de leveduras e mamíferos são altamente homólogos. Além disso, o processo de transcrição pela enzima RNA polimerase II (RNAP II) e as reações de processamento do pré-mRNA são eventos acoplados de grande relevância para o metabolismo de eucariotos pois mRNAs sem caudas de poli (A) são rapidamente degradados nas células vivas (KYBURZ *et al.*, 2003; GRIFFITHS *et al.*, 2019; MENEGIDIO *et al.*, 2020). Sabendo-se que lncRNAs são capazes de interferir na série de eventos que ocorrem durante o processamento do mRNA sob diferentes condições ambientais (CHACKO *et al.*, 2013; NADAL-RIBELLES *et al.*, 2014; CHATTERJEE *et al.*, 2016; SANCHEZ *et al.*, 2019), supomos que o lncRNA MSTRG.4058.1 encontrado *in vivo* em Pb18 possui potencial de atuar no metabolismo do fungo por meio de mecanismos epigenéticos relacionados com o processamento do mRNA através do CPF e a heterocromatina, possivelmente associados ao estresse ambiental.

CONCLUSÕES

Como os lncRNAs descritos neste estudo, tanto em âmbito computacional quanto *in vivo*, estão entre os poucos já identificados em fungos, nossos resultados não apenas aumentam os bancos de dados de lncRNA fúngicos atualmente disponíveis, mas também estabelecem uma base para investigações adicionais sobre a potencial regulação da expressão gênica mediada por lncRNAs em *Pb18*. Pelo fato de haver outros 202 lncRNAs putativos identificados *in silico* neste fungo, expandem-se nossas perspectivas em relação às suas possíveis funções no metabolismo celular de *Pb18*, tendo em vista que pelo menos uma dessas moléculas foi detectada *in vivo* no mesmo. Neste sentido, será necessário realizar mais experimentos para verificar a presença de outros lncRNAs *in vivo* neste fungo, além de suas funções específicas se positivamente identificados no mesmo.

REFERÊNCIAS

- CHACKO, Nadia *et al.* The lncRNA RZE1 controls cryptococcal morphological transition. **PLoS genetics**, v. 11, n. 11, p. e1005692, 2015.
- CHATTERJEE, Debashree *et al.* Transcription of lncRNA prt, clustered prt RNA sites for Mmi1 binding, and RNA polymerase II CTD phospho-sites govern the repression of *pho1* gene expression under phosphate-replete conditions in fission yeast. **RNA**, v. 22, n. 7, p. 1011-1025, 2016.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; CARROLL, S.B.; DOEBLEY, J. **Introdução à Genética**. 11. Ed. - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2019.
- JARROUX, J.; MORILLON, A.; PINSKAYA, M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. **Adv Exp Med Biol.**, vol. 1008, p. 1–46, 2017.
- KYBURZ, Andrea *et al.* The role of the yeast cleavage and polyadenylation factor subunit Ydh1p/Cft2p in pre-mRNA 3'-end formation. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 14, p. 3936-3945, 2003.
- MENDES, Rinaldo Poncio *et al.* Paracoccidioidomycosis: current perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 224, 2017.
- MENEGIDIO, Fabiano B. *et al.* Transcriptomic profiling identifies novel transcripts, isomorphs, and noncoding RNAs in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, 2020.
- MUÑOZ, José F. *et al.* Genome analysis reveals evolutionary mechanisms of adaptation in systemic dimorphic fungi. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.
- NADAL-RIBELLES, Mariona *et al.* Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA. **Molecular cell**, v. 53, n. 4, p. 549-561, 2014.
- OLIVEIRA, Aline Ferreira *et al.* Paracoccin distribution supports its role in *Paracoccidioides brasiliensis* growth and dimorphic transformation. **Plos one**, v. 12, n. 8, p. e0184010, 2017.
- PONTING, Chris P.; OLIVER, Peter L.; REIK, Wolf. Evolution and functions of long noncoding RNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 629-641, 2009.

SANCHEZ, Ana M. *et al.* Inositol pyrophosphates impact phosphate homeostasis via modulation of RNA 3' processing and transcription termination. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 16, p. 8452-8469, 2019.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida *et al.* Il consenso brasileiro em paracoccidiodomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500001, 2018.

TYCOWSKI, Kazimierz T. *et al.* Viral noncoding RNAs: more surprises. **Genes & development**, v. 29, n. 6, p. 567-584, 2015.