

Expressão gênica de RNA não codificador em linfócitos HLA-A2 sensibilizados com RNA sintético Poli(I)(C)

Noncoding RNA expression in HLA-A2 lymphocytes sensitized with Poli(I)(C) synthetic RNA

Maria Karine Amarante¹, Mateus Nóbrega Aoki², Juliana Laino do Val Carneiro³, Karen Brajão de Oliveira¹, Julie Massayo Maeda Oda², Roberto Tatakibara³, Maria Angélica Ebara Watanabe¹

Resumo

A ativação de células T inclui várias etapas como: eventos relacionados à transdução de sinal, ativação transcricional de vários genes, expressão de novas moléculas de superfície, secreção de citocinas ou funções efetoras e indução de atividade mitótica. Portanto existem várias metodologias que podem envolver a análise da ativação celular. Este trabalho teve como objetivo analisar a ativação celular *in vitro* utilizando a Biologia Molecular como ferramenta na detecção de RNA transcrito porém não traduzido, expresso nas células T ativadas. Para este fim, utilizamos células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) HLA-A2 para sensibilização *in vitro* com RNA sintético poly(i)(c). Foi verificado que após 24 horas houve a expressão do RNAm não codificador, conhecido como NTT, *noncoding transcript T cell RNA*.

Palavras-chave: Poli (i)(c), RNA NTT, linfócitos

¹ Docente do Depto de Ciências Patológicas, CCB/UUEL

² Iniciação Científica – Bolsista CNPq/UUEL

³ Mestrando em Patologia Experimental, UEL

* Endereço para correspondência: Depto, de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990 Tel: (43) 3371-5728, E-mail: maewat@sercomtel.com.br

Abstract

T cells activation includes many steps like: signal transduction events, transcriptional activation of many genes, new surface molecules expression, cytokines secretion, effectors functions and mitotic activity induction. Thus there are many methods that can involve cell activation analyses. The aim of this work was to analyze cell activation *in vitro* using molecular biology for untranslated transcript RNA detection, which is expressed in activated T cells. Therefore, we utilized H1A-A2 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for *in vitro* sensibilization with poli(i)(c) synthetic RNA. It was verified that after 24 hours there was expression of noncoding RNA, known like NTT, *noncoding transcript T cell RNA*.

Key words:

INTRODUÇÃO

A ativação dos linfócitos T, desencadeia uma série de respostas biológicas, incluindo eventos na membrana celular e citoplasma do linfócito T, sendo que alguns destes processos de sinalização, são muito semelhantes com processos relacionados a estímulos em células não linfóides⁽¹⁾.

É conhecido que quando o antígeno é apresentado à célula T ou o TCR (receptor das células T) liga-se a mitógenos ou anticorpos, ocorre uma série de eventos a nível citoplasmático e de membrana, como a fosforilação da tirosina das proteínas de membrana e citoplasma. Esta é considerada um componente essencial da transdução de sinal no caso de receptores de fatores de crescimento em vários tipos celulares e são detectáveis dentro dos primeiros minutos após a ligação do TCR com um ligante.

Em meados de 1950, era bem evidente que embora a localização do DNA fosse nuclear nas células eucarióticas, as proteínas eram sintetizadas no citoplasma na presença de grande quantidade de RNA⁽²⁾. Grande parte destes RNAs poderiam ser encontrados em discretas partículas no citoplasma⁽³⁾,

os quais mais tarde foram evidenciados como sítios de síntese protéica e denominados de ribossomos ⁽⁴⁾. Em 1952 James Watson introduziu o dogma central ^(5,6), com a idéia de que deveria existir um RNA que leva a informação do DNA para a maquinaria da síntese protéica no citoplasma, dando origem à hipótese: um gene, um ribossomo, uma proteína ^(4,7).

Durante muito tempo somente se discutia 3 tipos de RNAs (RNA ribossomal, transferência e mensageiro), embora muitas variedades de RNAs que não codificam para proteínas (RNAnc) tenham sido caracterizado nas últimas décadas, evidenciando que o RNA é mais complexo e sua transcrição é mais promiscua do que se imaginava ⁽⁸⁾.

Os genes RNAs que não codificam para proteínas ou RNAs não codificadores (RNAnc) produzem moléculas de RNAs funcionais antes de proteínas. É proposto que eles controlam a expressão gênica via interações seqüências-específicas com regiões regulatórias ⁽⁹⁾. No entanto, quase todos os meios de identificação de genes assumem que estes codificam proteínas, portanto mesmo na era do sequenciamento completo do genoma, os genes RNAnc não tem sido visualizados. Recentemente tem sido identificados grande número de novos genes RNAnc e tem sido proposto vários diferentes mecanismos de identificação para caracterização de novos genes de RNA ⁽¹⁰⁾.

Muitos RNAnc recentemente descobertos, estão relacionados com mecanismos de controle e regulação de funções celulares, associados a doenças, mas muitos ainda não têm sua função definida na célula. Estes vários RNAnc podem ser divididos em quatro grandes grupos segundo as suas afinidades e funções. O primeiro grupo seria composto por genes reguladores silenciosos, o segundo por genes de sinais de estresses abióticos, o terceiro por genes de sinais de estresse bióticos e o quarto e último grupo inclui RNAs de diferentes funções e origens ^(11,12).

EXPRESSION DE RNA REGULADOR EM LINFÓCITOS HUMANOS

Os RNAs são moléculas associadas com infecções virais e são produzidos pela maioria dos vírus em alguma fase de sua replicação. Os receptores TLR3 dos mamíferos reconhecem esses produtos microbianos como o RNA e o LPS. Estes receptores estão expressos na superfície celular onde podem se ligar com os produtos microbianos. Por isso células deficientes de PKR podem continuar respondendo a Poly (I).Poly.(C), um RNA sintético de cadeia dupla ⁽¹³⁾. Tem sido demonstrado por De Lucca et al., (2002) que RNA obtido de animais imunizados com peptídeo sintético do HIV (RNA-p9), pode induzir linfócitos T citotóxicos (CTL) humano. O RNA-p9 é capaz de ativar a PKR de linfócitos humanos, e a fração poli A+ do RNA-p9 foi responsável pela ativação da PKR.

Estudos recentes tem revelado um grupo de RNAs de mamíferos transcritos pela RNA polimerase II que não codificam para proteínas. A função destes RNAs parece envolver a regulação de genes. H19 foi identificado como um RNA murino expresso em fetos ⁽¹⁴⁾. XIST (Xi-specific transcript) foi identificado como um gene transcrito exclusivamente em cromossomos X inativos de fêmeas ⁽¹⁵⁾. IPW foi isolado de uma região de deleção do cromossomo 15 envolvido com a síndrome de Prader-Willi ⁽¹⁶⁾. Todos os três transcritos são poliadenilados e contém pequenos ORFS (open reading frames) e portanto não parecem codificar proteínas ^(15; 16). H19, XIST e IPW têm função na regulação da expressão gênica.

Liu e colaboradores (1997) identificaram um novo membro pertencente a este grupo de transcritos de mamíferos denominado de NTT (*noncoding transcript in T cells* RNA) o qual foi detectado casualmente durante uma pesquisa de genes que são expressos em subpopulações de linfócitos T, mais

especificamente nos linfócitos T CD4⁺ ativados. Este RNA tem sido identificado como um novo gene de 17 kb ⁽¹⁷⁾.

Muitos RNAm têm elementos estruturais na região 5' e 3' não traduzidos os quais podem regular a eficiência translacional. Tradução de vários mRNA tem sido envolvida com a interação de elementos estruturais, com os fatores específicos de iniciação e ribossomos, com fatores que mobilizam o mRNA do núcleo para o citoplasma e fatores que regulam a tradução do mRNA em resposta a necessidades celular. Estruturas secundárias dentro de RNA de simples fita tem também regulado a atividade de proteínas quinases dependente de RNA, um potente inibidor da síntese protéica. É conhecido que RNAs sintéticos de dupla fita denominados Poly(D).Poly(C), podem induzir linfócitos humanos a produzir IFN-gama. A natureza desta interação e a significância fisiológica da regulação permanecem a ser elucidado.

A ativação de células T inclui várias etapas como: eventos relacionados a transdução de sinal, ativação transcricional de vários genes, expressão de novas moléculas de superfície, secreção de citocinas ou funções efetoras e indução de atividade mitótica. Portanto existem várias metodologias que podem envolver a análise da ativação celular. Este trabalho teve como objetivo analisar a ativação celular *in vitro* utilizando a Biologia Molecular como ferramenta na detecção de RNA transcrito porém não traduzido, expresso nas células T ativadas. Para este fim, utilizamos um sistema o qual inclui um peptídeo sintético do HIV-1 e células mononucleadas do sangue periférico (PBMC).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de células mononucleadas do sangue periférico

Foram selecionadas células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) cujo haplótipo inclui HLA-A2. O material foi proveniente da rotina do Laboratório de Histocompatibilidade do Hospital regional Universitário de Londrina-PR.

O sangue total foi diluído em igual volume de RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, EUA) suplementado com SFB a 10% e L- glutamina. O sangue diluído foi aplicado nas paredes de tubos (Coming 50 ml) estéreis contendo Ficoll-Hypaque (Sigma, EUA). Após a centrifugação, as células mononucleares retidas na interfase Ficoll-Hypaque-plasma foram retiradas com auxílio de pipetas Pasteur e lavadas duas vezes em RPMI 1640 (sigma-EUA). As células então obtidas foram ressuspensas em meio RPMI e lavadas 3 vezes com centrifugações sucessivas a 200 x g por 10 min. A concentração final de células foi ajustada para 10^7 células/6ml de RPMI 1640 e mantidas a 37°C a 5% de CO₂ na presença ou ausência de estímulo.

Sensibilização “*in vitro*” dos linfócitos de doadores normais

Obteve-se células mononucleares do sangue periférico de doadores normais por gradiente em Ficoll-Hypaque e após ressuspensas em meio RPMI foram contadas em câmara de Neubauer acopladas em um Microscópio Óptico para acerto de contração final (10^6 células/ml). As células foram então mantidas em cultura na presença do RNA sintético Poly(D).Poly(C), em várias doses para diferentes tempos com o objetivo de otimizar o sistema. Como controle positivo de ativação foram utilizadas IL-2 dependendo do tipo de experimento.

Obtenção de RNA

RNA de PBMC (10^6 células/ml) sensibilizado com Poly(D).Poly(C), durante 48 horas. Foram extraídas utilizando-se *Trizol LS Reagent* (Gibco BRL-Life technologies) e RNA poli A+, que foram isolados utilizando-se Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech).

Síntese de DNAc

Transcrição reversa foi realizada a partir de 8 μ l de RNA com 50 pmoles de oligo d(T), 16 primer (Perkin Elmer) e 0,5 U de Mulv reverse transcriptase (Perkin Elmer) a 42°C por 60 min. Esta reação foi tratada com 1U de Dnase (Pharmacia) sendo sempre comparada com DNA controle (ausência de Dnase). A reação foi realizada em Tampão específico (50mM Tris HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200mM of dNTP).

Reação em cadeia polimerásica (PCR) da β -actina

Os primers utilizados para a amplificação foram obtidos de acordo com o GenBank (Accession number: BC014861). O PCR foi realizado no termociclador PCR (Sprint Hybaid) e utilizou-se 20mM de Tris HCl pH 8,4, 50mM de KCl, 1,5Mm de MgCl₂, 200 μ M de dNTP e 0,5U de Taq polimerase. O ciclo total constituiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, a 55°C por 30 segundos e a 72°C por 1 minuto, com extensão final de 10 minutos a 72°C. O fragmento amplificado de β -actina possui 353 pares de base.

Reação em cadeia polimerásica (PCR) do NTT

Primers NTT foram utilizados para amplificar NTT-DNac. Os primers foram desenhados baseados na seqüência do NTT (*GenBank sequences - Liu et al., 1997 - U54776*). O PCR foi realizado com 20mM Tris HCl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5 mM

MgCL₂, 200µM dNTP e 0,5 units de Taq polymerase. O ciclo total consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min. seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min., 45°C por 1 min. e 72°C por 1 min. e uma extensão final de 72°C por 10 min. Foi utilizado 8ml de NAc da reação de transcriptase reversa para o PCR. O produto de 426 bp foi utilizado por eletroforese em gel agarose contendo brometo de etídio.

A especificidade da detecção será demonstrada por sequenciamento direto (377DNA *sequencer*, ABI PRISM™ – Perkin Elmer) do produto de PCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para demonstrar a integridade do RNA, inicialmente verificamos se o RNA obtidos das PBMCs e proveniente das culturas de células se apresentavam íntegros e eram capazes de amplificar um gene constitutivo, o RNAm da β -actina do meio intra-celular, utilizando primers específicos. Como resultado desta PCR foi observado a presença da banda esperada, indicando que esses RNAs estavam íntegros, sendo então possível a realização de sua amplificação para outros fragmentos propostos por este trabalho (Figura 1). Em todas as reações, foi sempre realizado um controle negativo (ausência de DNA) a fim assegurarmos a ausência de contaminação como também um controle positivo (DNA conhecido com concentração determinada).

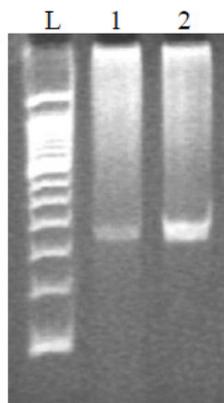


Figura 1. Integridade das amostras de RNA obtidos das células provenientes de cultura. Amplificação de uma banda de 353 pb, específica para β actina. Somente a seqüência esperada foi observada em gel de acrilamida, indicando a integridade das amostras de RNA e ausência de contaminação por DNA genômico.

L: Ladder 100 bp 1: Ausência de p9 2: Presença de p9

O gene NTT é um RNA não codificador encontrado em células T CD4 de humanos. Há diferentes subtipos de células T CD4, sendo elas responsáveis por vários aspectos da resposta imune, sendo assim, são divididas em vários subgrupos, de acordo com o tipo de citocina que liberam. Estas diferentes funções próprias para cada clone das células T CD4 refletem os diferentes genes necessários para a ativação dessas citocinas e expressão de proteínas que envolvem a citólise ⁽¹⁷⁾. O NTT é um gene que produz um RNAnc, poliadenilado e que não possui ORF (*open reading frames*) maior que 270 pares de bases ⁽¹²⁾, estes possíveis ORFs delineados podem começar ou terminar a leitura dos códons, sendo facilmente transcritos pela RNAPolimerase II. Além das células T CD4 foram testadas

várias outras células mononucleares do sangue periférico, incluindo: células T, células B, células NK e monócitos. Os linfócitos T CD8 apresentaram baixos níveis de expressão de NTT, já as outras células se apresentaram negativas para a expressão de NTT, demonstrando que o NTT é expresso predominantemente em células T, especialmente nas células T CD4. A expressão do NTT pode ser detectada em baixos níveis em células T não ativadas, mas em células T ativadas sua expressão é extremamente maior ⁽¹⁷⁾. Verificamos que os ensaios de sensibilização das PBMCs com Poly(i)(c) apresentaram a expressão do RNAm do NTT, enquanto os ensaios sem a sensibilização com o Poly(i)(c) não apresentaram esta expressão (figura 2).

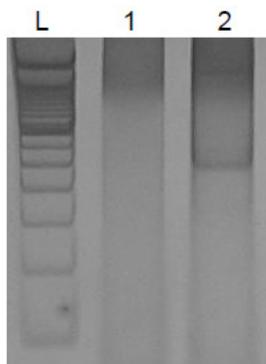


Figura 2. Expressão do RNAm-NTT . Amplificação do fragmento compatível com uma banda de 426 pb, Somente a seqüência esperada foi observada em gel de poliacrilamida, indicando a especificidade do *primer* utilizado. L: Ladder 100bp 1: Ausência de p9 2: Presença de p9

As amostras do produto de PCR do RNAm do NTT foram analisadas no seqüenciador ABI-PRISM (Perkin Elmer), sendo

que as seqüências obtidas foram compatíveis com as depositadas no *GenBank Accession number*: U54776 para NTT.

Estudos revelaram que os RNAs reguladores obtidos de células ativadas apresentam atividade imunomoduladora, sugerindo um possível potencial terapêutico para estes riborreguladores ^(18, 19,20, 21; 22).

É sabido que os RNAs reguladores são expressos quando as células sofrem estímulos externos, sendo que estes estudos são limitados na grande maioria a células procarióticas ⁽²³⁾.

Os resultados deste trabalho demonstram que células mononucleadas HLA-A2 do sangue periférico humano quando em presença de poly(I)(C) são capazes de expressar RNA regulador transcrito, porém não codificador. Este processo pode estar relacionado com ativação celular devido a concomitante expressão de RNAm de interferon gama e aumento de expressão de moléculas CD4 e CD8 a nível de membrana celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica, Artes Médicas Sul, São Paulo-SP 725-931, 1999.
2. Brachet J, Chantrenne H. The function of the nucleus in the synthesis of cytoplasmic proteins. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1956;21:329-37
3. Palade GE. A small particulate component of the cytoplasm. J Biophys Biochem Cytol. 1955 Jan;1(1):59-68
4. Crick FH. On protein synthesis. Symp Soc Exp Biol. 1958;12:138-63
5. Judson PN, Fox J, Krause PJ. Using new reasoning technology in chemical information systems J Chem Inf Comput Sci. 1996 Jul-Aug;36(4):621-4.

6. Gesteland RF, Atkins JF. Intricacies of ribosomal frameshifting. *Nat Struct Biol.* 1999 Mar;6(3):206-7
7. Brenners S. RNA, ribosomes, and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1961;26:101-10.
8. Dye MJ, Gromak N, Haussecker D, West S, Proudfoot NJ. Turnover and Function of Noncoding RNA Polymerase II Transcripts. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:275-84.
9. Zaratiequi M, Irvine DV, Martienssen RA. Noncoding RNAs and gene silencing *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):763-76
10. Eddy SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet.* 2001 Dec;2(12):919-29.
11. Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J. Collection of mRNA-like non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1999 Jan 1;27(1):192-5.
12. Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, Groot N, Barciszewski J. Non-coding, mRNA-like RNAs database Y2K. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):197-200.
13. Alexopoulos L. et al Recognition of Double-stranded RNA and Activation of NF- κ B by Toll-like Receptor 3. *Nature* 413: 732-738, 2001.
14. Pachnis V, Brannan CI, Tilghman SM. The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *EMBO*, 7:673-681, 1988.
15. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349:38-44,1991.
16. Wevrick R, Kerns JÁ, Francke U. Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* 3:1877-1882, 1994.
17. Liu, AY et al. The Human NTT Gene: Identification of a Novel 17-Kb Noncoding Nuclear RNA Expressed in Activated CD4 Tcells. *Genomics* 39: 171-184, 1997.

18. De Lucca FL, Sales VS, Souza LR, Murad JM, Watanabe MA. Regulatory RNA induces the production of IFN-gamma, but not IL-4 in human lymphocytes: role of RNA-dependent protein kinase (PKR) and NF-kappaB. *Mol Cell Biochem.*;247(1-2):211-7., May, 2003.
19. De Lucca FL et al Activation of RNA-dependent Protein Kinase and Nuclear Factor-kB by Regulatory RNA from Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages: Implications for Cytokine Production. *European J. Pharmacol.* 450: 85-69, 2002.
20. De Lucca FL et al Evidence for the Involvement of RNA-dependent Protein Kinase in the Induction of Cytotoxic T Lymphocytes Against a Synthetic Peptide of HIV-1 with Regulatory RNA. *Mol. Cel. Biochem.*, 238: 19-26, 2002.
21. De Lucca FL, Sawan FM, Watanabe MA, de Souza LR. Effect of the calcium phosphate-mediated RNA uptake on the transfer of cellular immunity of a synthetic peptide of HIV-1 to human lymphocytes by exogenous RNA. *Mol Cell Biochem.* 2001 Dec;228(1-2):9-14.
22. Watanabe MAE, Souza LR, Murad JM, De Lucca FL Antitumor activity induced by regulatory RNA: Possible role of RNA-dependent protein kinase and nuclear factor-kâ *European Journal of Pharmacology* 465 (2003) 205-210
23. Szymanski M, Barciszewski J. Beyond the proteome: non-coding regulatory RNAs. *Genome Biol.* 2002;3(5):reviews0005. Epub 2002 Apr 15